

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES PHYTOHORMONES DANS
LES MACROALGUES DE L'EST DU CANADA**

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

DANS LE CADRE DU PROGRAMME DE MAÎTRISE SUR MESURE (CHIMIE)

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE MAÎTRE ÈS SCIENCES

PAR

© VÉRONIQUE LANGLOIS

JANVIER 2021

Composition du jury :

Jonathan Gagnon, directeur de recherche, UQAR

Youssef Soubaneh Djibril, examinateur interne, UQAR

André Pichette, examinateur externe, UQAC

Dépôt initial 1 septembre 2020

Dépôt final 6 Janvier 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

« Faites ce que vous avez à faire
jusqu'à ce que vous puissiez
faire ce que vous désirez faire »

Oprah Winfrey

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de recherche, M. Jonathan Gagnon pour son aide considérable et dévouée dans ce projet. Merci d'avoir partagé vos connaissances. Je remercie le personnel de Merinov, et plus particulièrement, Marie-Gil Fortin, Marie-Élise Carbonneau, Diane Ouellet, Arnold Blais et Maude Sirois, pour leur assistance durant mes stages. Je voudrais aussi remercier le personnel de l'UQAR, plus particulièrement Steeven Ouellet, Jonathan Coudé et Marie-Ève Anglehart pour leur aide en laboratoire. Un mot de remerciement ne serait pas complet sans dire merci à tous ceux et celles qui m'ont accompagnée et soutenue durant ces deux années de formation. Plus particulièrement, à celui qui m'a soutenu au quotidien. Finalement, je remercie grandement le programme *Mathematics of Information Technology and Complex systems* (MITACS) pour leur support financier, sans quoi cette recherche aurait été impossible.

AVANT-PROPOS

Ce document contient l'intégralité de deux années de recherche sur la mise au point de méthodes analytiques pour la quantification des phytohormones dans les macrophytes benthiques (désigné « algues » ou encore « macroalgues » dans ce mémoire). Initialement, le projet a été entrepris par Merinov et l'Université du Québec à Rimouski (UQAR) dans l'objectif de trouver une méthode de suivi de qualité lors de la préparation d'engrais liquides enrichie en phytohormones. Ensuite, le projet a pris de l'ampleur et des objectifs plus larges ont été ciblés. Le chapitre 1 contient l'introduction générale qui illustre différents aspects du projet soit la situation actuelle des algues au Québec, le contenu de celles-ci et une revue des méthodes d'analyse. Le premier article (chapitre 2) porte sur le développement d'une méthode colorimétrique de quantification des auxines dans des extraits d'algues. Le troisième chapitre porte sur des méthodes analytiques plus globales permettant d'identifier des composés de types phytohormones en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Ces méthodes ont pour objectifs d'analyser le contenu en phytohormones dans les algues et dans des extraits liquides concentrés.

Les algues sont reconnues en agriculture comme engrais de choix. Elles contiennent plusieurs types de composés telles que les phytohormones qui favorisent la croissance. Les phytohormones sont des composées qui agissent comme des biostimulants. Il existe différentes classes de composés ayant des attributs différents qui permettent d'améliorer les rendements et la croissance des végétaux. Malheureusement, dans la littérature, on retrouve peu d'informations sur le contenu des algues du Québec en matière de phytohormone. J'espère que ces recherches permettront de favoriser l'utilisation des macroalgues dans plusieurs domaines et la valorisation de cette biomasse sous-exploitée. Ce travail est réparti en quatre chapitres, soit l'introduction générale, deux chapitres présentant les résultats expérimentaux et la conclusion générale.

RÉSUMÉ

L'agriculture biologique est en pleine expansion. Les macroalgues sont utilisées en agriculture biologique comme source de nutriments, mais également pour leurs propriétés biostimulantes lesquelles proviennent des phytohormones. Les macroalgues sont abondantes au Canada et peuvent conduire au développement de produits utiles pour l'agriculture. Le contenu en phytohormones peut mener, entre autres, à des produits qui stimulent la croissance et la résistance aux stress biotiques et abiotiques.

L'objectif du projet de recherche est de développer une méthode simple et rapide de quantification des différentes phytohormones présentes à l'intérieur de quatre espèces de macroalgues québécoises, ce qui permettra d'effectuer le suivi lors du développement et de l'optimisation des procédés d'extraction et de filtration de concentrés de macroalgues.

Les phytohormones sont extraites des macroalgues par macération et extraction accélérée par solvant (ASE), purifié par extraction en phase solide avant d'être quantifié en colorimétrie. Ces méthodes sont appliquées pour la première fois à notre connaissance à la *Saccharina latissima*. Par la suite, le développement de méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse (GC-MS et LC-MS orbitrap) sera envisagé pour l'identification des phytohormones. Ceci sera une première étape de recherche dans la mise au point de méthode chromatographique. En usine pilote, des concentrés d'algues seront développés et optimisés à partir des méthodes analytiques existantes.

Ce mémoire a permis de développer une nouvelle méthode analytique de quantification de l'acide indole-butyrique (IBA) dans la *Saccharina latissima* en colorimétrie avec le réactif d'Ehrlich. De plus, il a été possible d'identifier de façon qualitative la présence d'acide indole-acétique (IAA) dans les extraits d'algues de *S. latissima* au GC-MS et de séparer l'acide salicylique (SA), l'acide gibbérellique (GA), la kinétine (K), l'IAA et l'IBA contenu dans un mélange de standards au LC-MS. Ces derniers travaux préliminaires ouvrent la voie à de nouvelles recherches analytiques sur les algues. Le faible niveau de détection au GC-MS dû aux faibles concentrations en phytohormones et les limitations dans la disponibilité du LC-MS, n'ont pas permis davantage d'étude en chromatographie.

Mots-clés : Colorimétrie, phytohormones, auxines, cytokinines, cinétiques, optimisation, valorisation, biomasse.

ABSTRACT

Organic farming is booming. Macroalgae are used in organic agriculture as a source of nutrients, but also for their biostimulant properties, which come from phytohormones. Macroalgae are abundant in Canada and can lead to the development of useful products for agriculture. The phytohormone content can lead, among other things, to products that stimulate growth and resistance to biotic and abiotic stresses.

The objective of this project is to develop a simple and rapid method for quantifying the different phytohormones present in four species of Quebec macroalgae, which will allow the follow-up during the development and the optimization of the processes of extraction and filtration of macroalgae concentrates.

Phytohormones are extracted from macroalgae by maceration and accelerated solvent extraction (ASE), purified by solid phase extraction before being quantified in colorimetry. These methods are applied for the first time to our knowledge for *Saccharina latissima*. Subsequently, the development of chromatographic methods coupled with mass spectrometry (GC-MS and LC-MS orbitrap) will be considered for the identification of phytohormones. This will be a first stage of research in the development of a chromatographic method. In the pilot plant, algal concentrates will be developed and optimized using existing analytical methods.

This thesis has made it possible to develop a new analytical method for the quantification of indole-butyric acid (IBA) in *Saccharina latissima* in colorimetry with Ehrlich's reagent. In addition, it was possible to qualitatively identify the presence of indole acetic acid (IAA) in the extracts of algae of *S. latissima* with GC-MS and to separate the salicylic acid (SA), gibberellic acid (GA), kinetin (K), IAA and IBA contained in a mixture of standard by LC-MS. These preliminary work paves the way for further analytical research on algae. The low level of detection with GC-MS due to the low concentrations of phytohormones and the limitations in the availability of LC-MS, did not allow further study in chromatography.

Keywords: Colorimetry, phytohormones, auxins, cytokinins, kinetics, optimization, valorization, biomass.

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ix
AVANT-PROPOS	xi
RÉSUMÉ.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
TABLES DES MATIÈRES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX	xxiii
LISTE DES FIGURES	xxv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xxix
LISTE DES ÉQUATIONS	xxxv
LISTE DES SYMBOLES.....	xxxvii
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1. LES ALGUES.....	2
1.1 LE SAINT-LAURENT MARITIME.....	2
1.2 MARCHÉ DES ALGUES	4
1.3 ESPÈCES MAJORITAIRES	6
1.3.1 Rhodophyceae.....	6
1.3.2 Chlorophyceae	7
1.3.3 Pheaophyceae.....	7
1.3.3.1 Fucales (<i>Ascophyllum</i> et <i>Fucus</i>)	8
1.3.3.2 Laminaires (<i>Alaria esculenta</i> et <i>Saccharina latissima</i>).....	9
2. PRINCIPALES VOIES DE VALORISATION DES ALGUES.....	10
2.1 ALIMENTATION	10
2.1.1 Utilisation directe et indirecte dans l'alimentation humaine	10
2.1.2 Utilisation dans l'alimentation animale	11
2.2 AGRICULTURE	11
2.3 AUTRES	11

3. COMPOSITION DES ALGUES	13
3.1 MINÉRAUX.....	13
3.2 MÉTABOLITES PRIMAIRES	14
3.2.1 Polysaccharides	14
3.2.2 Protéines	15
3.2.3 Lipides.....	15
3.2.3.1 Stérols.....	16
3.3 MÉTABOLITES SECONDAIRES.....	16
3.3.1 Terpènes	16
3.3.2 Pigments	17
3.3.3 Composés phénoliques.....	17
3.3.4 Oxylipines	18
3.3.5 Quinones.....	19
3.3.6 Hydroquinones	19
3.3.7 Hydrocarbures volatils	19
3.3.8 Vitamines	19
3.3.9 Les phytohormones	20
4. LES PHYTOHORMONES	20
4.1 CLASSES DES PHYTOHORMONES	21
4.1.1 Auxines.....	21
4.1.2 Brassinostéroïdes (BR).....	23
4.1.3 Cytokinines (CTK).....	23
4.1.4 Éthylène.....	24
4.1.5 Gibbérellines (GA).....	25
4.1.6 Phytoalexines (PA).....	26
4.1.7 Strigolactones (St).....	27
4.1.8 Acides abscissiques (ABA).....	27
4.1.9 Acides jasmoniques (JA).....	28
4.1.10 Acide salicylique (SA)	29
4.1.11 Résumé des principales fonctions associées aux phytohormones.....	30
5. MÉTHODES DE PRÉPARATION, D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES PHYTOHORMONES ISSUES DE LA LITTÉRATURE	31

5.1	Prétraitement des algues	31
5.2	Extraction des composés actifs	31
5.2.1	Choix du solvant d'extraction.....	32
5.2.2	Extraction par macération	32
5.2.3	Extraction au Soxhlet.....	32
5.2.4	Extraction par hydrodistillation	33
5.2.5	Extraction assistée par ultrasons (UAE)	33
5.2.6	Extraction par micro-ondes (MAE)	33
5.2.7	Extraction par solvant accéléré (ASE).....	33
5.3	Purification des extraits d'algues	34
6.	MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES PHYTOHORMONES ISSUES DE LA LITTÉRATURE	38
6.1	Quantification des composés actifs par des tests enzymatiques ELISA.....	38
6.2	Quantification des auxines par colorimétrie	39
6.2.1	Spectroscopie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet (UV) et le visible.....	39
6.2.2	Appareils utilisés en spectroscopie	41
6.2.3	Équations utilisées en spectroscopie d'absorption.....	42
6.3	Quantification des phytohormones par des méthodes chromatographiques.....	43
6.3.1	Principe des appareils utilisés en chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse	45
6.3.1.1	Général.....	45
6.3.1.2	Ionisation	46
6.3.1.3	La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR)..	48
6.3.1.4	L'Orbitrap	48
6.3.1.5	Quantification	49
6.3.1.6	Fragmentation	49
7.	TRAVAUX RÉALISÉS SUR LES PHYTOHORMONES DANS LES ALGUES	51
8.	MISE EN CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE ET OBJECTIFS	56
8.1	OBJECTIFS SPÉCIFIQUES ET HYPOTHÈSES.....	57
8.1.1	OBJECTIF SPÉCIFIQUE 1.....	57
8.1.2	OBJECTIF SPÉCIFIQUE 2.....	57

8.1.3 OBJECTIF SPÉCIFIQUE 3	59
8.2 STRUCTURE DU MÉMOIRE.....	59
CHAPITRE 2	62
PREMIER ARTICLE.....	62
ÉTUDE DE LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE EHRLICH POUR LA QUANTIFICATION DE L'ACIDE INDOLEBUTYRIQUE: APPLICATION AUX ALGUES DE <i>SACCHARINA LATISSIMA</i>	62
2.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU PREMIER ARTICLE.....	63
2.2 STUDY OF THE EHRLICH COLORIMETRIC METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF INDOLEBUTYRIC ACID: APPLICATION TO THE <i>SACCHARINA LATISSIMA</i> SEAWEED	64
Abstract	65
1. Introduction.....	66
2. Experimental section.....	69
3. Results and Discussion.....	72
4. Abbreviation.....	85
5. Acknowledgement	85
Graphical abstract.....	86
CHAPITRE 3	88
DÉVELOPPEMENTS DE MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES COUPLÉES À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	88
1. Résumé.....	89
2. Introduction	90
3. Méthodologie	93
4. Résultats et discussion	98
5. Conclusion	103
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	104
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110
Annexe 1 : Fiche nutritionnelle de la <i>Saccharina latissima</i> [28].....	119

Annexe 2 : Fiche nutritionnelle de la <i>Fucus serratus</i> , <i>vesiculosus</i> [29].....	121
Annexe 3: Supporting information	123
Study of the Ehrlich colorimetric method for the quantification of indolebutyric acid: Application to the <i>Saccharina latissima</i> seaweed	123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Polysaccharides contenus dans des <i>Phaeophyceae</i> [25].....	15
Tableau 2 : Contenu en protéines dans diverses algues marines utilisées dans l'industrie alimentaire [25].....	15
Tableau 3 : Principales fonctions associées aux phytohormones [5].....	30
Tableau 4 : Méthodes de purification recommandées par la compagnie Agilent pour le traitement des cartouches Plexa PAX et PCX [60].....	36
Tableau 5 : Caractéristiques de l'absorption de quelques chromophores organiques courants [65].	40
Tableau 6 : Types de colonnes utilisées pour la quantification des phytohormones par GC-MS.....	44
Tableau 7 : Types de colonnes utilisées pour la quantification des phytohormones au LC-MS	45
Tableau 8 : Littérature sur les phytohormones retrouvées dans les algues.....	51
Tableau 9 : Paramètres et conditions d'analyse de l'IAA par GC-MS [67].	95
Tableau 10 : Information sur les ions précurseurs à l'étude	98
Tableau 11 : Droite de calibration et domaine de linéarité.....	101
Tableau 12 : Répétabilité de la méthode (n=5).....	102

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Carte identifiant les zones des différents inventaires de fucacées et de laminaires ayant eu lieu au Québec [9].....	3
Figure 2 : Nombre de relevés d’algues répertoriés au Québec (données interactives disponibles sur le site de l’OGSL (https://ogsl.ca/bio/)) [10].....	4
Figure 3 : Identification des macroalgues (A : <i>Fucus vesiculosus</i> , B : <i>Ascophyllum nodosum</i> , C : <i>Saccharina latissima</i> , D : <i>Alaria esculenta</i>) [8]	10
Figure 4 : Nombre d’articles scientifiques publiés sur les algues depuis les 30 dernières années (Source Web of Science; recherche faite le 30 mai 2019).....	12
Figure 5: Tendances des recherches effectuées sur les algues en 2019 (Source Web of Science; recherche faite le 30 mai 2019)	12
Figure 6 : Nomenclature de certains des composés phénoliques d'origine naturelle [25].	18
Figure 7 : Structure chimique des auxines [36,37].	21
Figure 8 : Structures de brassinostéroïdes retrouvés dans les plantes [36].....	23
Figure 9 : Structure chimique de l'adénine	24
Figure 10 : Principales cytokinines retrouvées dans les plantes [36]	24
Figure 11 : Structure de l'éthylène	25
Figure 12 : Acide gibbérellique ou GA ₃	25
Figure 13 : Structures et abréviations de quelques gibbérellines [40]......	26
Figure 14 : Structure des strigolactones avec différents éléments structuraux possibles [44]......	27
Figure 15 : Structures des composés associés aux ABA [36]......	28
Figure 16 : Structures de quelques jasmonates retrouvés dans les végétaux [36]	28
Figure 17 : Structures des salicylates retrouvés dans les végétaux [36].....	29
Figure 18 : Schéma de l’extraction et de la purification de phytohormones et de leurs métabolites [49]	35
Figure 19. Schéma de la purification des phytohormones sur une cartouche SPE PAX (1) conditionnement de la cartouche (2) ajout de l’échantillon prétraité avec de l’ammonium (3) lavage (4) récupération de l’échantillon avec l’acide formique	37

Figure 20 : Formats courants de l'immobilisation de l'antigène pour un test ELISA [62]	38
Figure 21 : Schéma simplifié d'un spectrophotomètre UV-visible.....	41
Figure 22 : Schéma général d'un spectromètre de masse [72].....	46
Figure 23 : La transition verticale des molécules excitées par l'énergie cinétique des électrons [73].....	47
Figure 24 : Schéma d'une interface d'ESI [72].....	47
Figure 25 : Schéma de l'Orbitrap [75]	49
Figure 26. Absorption spectra of IAA-PDAB (grey continuous line) and IBA-PDAB (black continuous line) derivatives at 1,00 mM with 0.02 M of PDAB and 5 M of HCl at rt and IAA-PDAB (grey dotted line) and IBA-PDAB (black dotted line) at 70°C.....	73
Figure 27. Formation of products from the reaction of PDAB with indole moieties	74
Figure 28. Variation of the concentration of HCl with PDAB 0.10 M and 0.4 mM of IBA at rt during 18 h (black diamond), IBA (black circle) and IAA (gray square) at 70°C during 210 min.....	74
Figure 29. Variation of PDAB concentration with HCl 5 M in water on the reaction with 0.4 mM of IBA at rt during 18 h (black diamond), IBA (black circle) and IAA (gray square) at 70°C during 210 min.....	76
Figure 30. Variation of PDAB concentration with 5 M HCl in methanol on the reaction with 0.4 mM of IBA at rt during 18 h (black diamond), IBA (black circle) and IAA (gray square) at 70°C during 210 min.....	77
Figure 31. Kinetics of reaction measured at 583 nm with several concentrations of IBA (from top to bottom for concentration in mM: 20, 2, 1.5, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125), 0.02 M PDAB and 5 M of HCl at rt.....	78
Figure 32. Kinetics of the reaction of IAA 5 mM (gray square), IBA 5 mM (black circle) and mixture of the two auxins 5 mM each (black triangle) with 0.02 M PDAB and 5 M of HCl at 70°C followed at 583 nm.....	79
Figure 33. Kinetics of the reaction of IAA 5 mM (gray square), IBA 5 mM (black circle), and mixture of the two auxins 5 mM each (black triangle) with 0.10 M PDAB at 70°C followed at 583 nm.....	80

Figure 34 : Structures chimiques des phytohormones utilisées lors du développement de la méthode de quantification en LC-MS.....	93
Figure 35 : Chromatogramme et spectre de masse du standard IAA issus des analyses GC-MS.....	99
Figure 36 : Chromatogramme de l'extrait d'algue dérivé et spectre de masse en mode SIM (130.1 et 189.1) issus des analyses GC-MS	99
Figure 37 : Chromatogramme du mélange de standards SA, GA, K, IAA et IBA aux concentrations respectives de 21,0; 19,3; 11,6; 11,2; 13,6 µg/mL, issus des analyses LC-MS.....	100
Figure 38 : Chromatogramme de chaque pic de base des standards SA, GA, K, IAA et IBA en utilisant une gamme de masse pour l'indentification, issus des analyses LC-MS	101

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

A₃	Gibbérelline
ABA	Acide abscissique
ABAGE	Acide abscissique glucose ester
ABIA	Acide 3-indolyl-acétique
ACC	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
API	Ionisation à pression atmosphérique
ASE	Extraction par solvant accéléré / Extraction par fluide pressurisé
BA	Acide benzyladénine
6-BA	Benzylaminopurine
BL	Brassinolide
BR	Brassinostéroïdes
CH₂N₂	Diazométhane
CRABE	Collectif de Recherche appliquée aux Bioprocédés et à la chimie de l'Environnement
CTK	Cytokinines
c-Z	<i>cis</i> -Zéatin
c-ZOG	<i>cis</i> -Zéatin-O-glucoside
c-ZR	<i>cis</i> -Zéatin riboside
cZR-OG	<i>cis</i> -Zéatin riboside-O-glucoside

cZR-5MP	<i>cis</i> -Zéatin riboside-5'-monophosphate
DHZ	Dihydrozéatin
dhZ	Dihydrozéatin
dhZR	Dihydrozéatin riboside
DPA	Acide dihydrophaseic
EHI	Ionisation électrohydrodynamique
EI	Énergie d'ionisation
EIA	Dosage immuno-enzymatique
ESE	Extraction améliorée par solvant
ESI	Ionisation par électronébulisation
FT	Transformée de Fourier
GA	Gibbérellines
GA₃	Acide gibbérellique
GC	Chromatographie gazeuse
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HP-LC	Chromatographie liquide haute pression
HSPE	Extraction par solvant haute pression
IAA	Acide indole-3-acétique
IAA-Ala	N-(Indole-3-yl-acetyl)-alanine
IAA-Asp	Acide N-(Indole-3-yl-acetyl)-aspartique

IAA-Glu	Acide N-(Indole-3-yl-acetyl)-glutamique
IAA-Leu	N-(Indole-3-yl-acetyl)-leucine
IBA	Acide indole-3-butyrique
ICR	Résonance cyclotronique ionique
iP	Isopentenyladénine
iPA_a	N6-(2-isopentenyl)adénosine
IPAb	N6-(2-isopentyl)adénosine
iPR	Isopentenyladénosine riboside
iPR5MP	isopentenyladénosine-5-monophosphate
JA	Acide jasmonique
K	Kinétine
KR	Kinétine riboside
LC	Chromatographie liquide
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LLE	Extraction liquide-liquide
MAE	Extraction assistée par micro-ondes
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
TMSCHN₂	Triméthylsilyldiazométhane
m-T	<i>meta</i> -topolin

<i>m</i>-TOG	<i>meta</i> -topolin-O-glucoside
NAA	acide 1-naphtalenacétique
neo-PA	Acide <i>neo</i> -phaseic
NPK	Azote, phosphore, potassium
OGSL	Observatoire global du Saint-Laurent
7'OH-ABA	Acide 7'-hydroxyabscisique
<i>o</i>-T	<i>ortho</i> -topolin
<i>o</i>-TOG	<i>ortho</i> -topolin-O-glucoside
<i>o</i>-TR	<i>ortho</i> -topolin riboside
PA	Phytoalexines
PAA	Acide phénylacétique
PAX	Phase échangeuse d'anions en mode mixte
PCX	Phase échangeuse de cations en mode mixte
PDA	Détecteur à barrette de diodes
PDAB	<i>para</i> -diméthylaminobenzaldéhyde
PFE	Extraction par fluide sous pression
SA	Acide salicylique
SPE	Extraction en phase solide
St	Strigolactones
<i>t</i>-ABA	Acide <i>trans</i> -abscisiques

<i>t-Z</i>	(<i>trans</i>) Zeatin
<i>t-ZOG</i>	(<i>trans</i>) Zeatin-O-glucoside
<i>t-ZR</i>	(<i>trans</i>) Zeatin riboside
<i>t-ZR-5MP</i>	<i>trans</i> -Zeatin riboside-5'-monophosphate
UAE	Extraction assistée par ultrasons
UV	Ultraviolet
VMAE	Extraction par micro-ondes sous vide

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1 : Transmittance	42
Équation 2 : Absorbance	42
Équation 3 : loi de Beer–Lambert-Bouguer	42
Équation 4 : Absorbance avec plusieurs chromophores	43

LISTE DES SYMBOLES

A	Absorbance
<i>c</i>	Concentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
ϵ	Coefficient d'extinction molaire ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
I_0	Intensité incidente
I	Intensité transmise
<i>l</i>	Longueur du chemin optique (cm)
λ	Longueur d'onde (nm)
T	Transmittance

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La demande en ressource alimentaire ne cesse de croître et l'intérêt de produire de façon responsable est grandissant au sein de la population. Le secteur de l'agriculture se tourne donc vers la production de produits biologiques. Par ailleurs, les côtes de l'Est du Canada sont riches en algues brunes qui se regroupent en herbiers marins très denses. Les algues de l'ordre des Fucales et Laminariales sont les plus importantes et suscitent un intérêt marqué par les compagnies québécoises. Des entreprises québécoises établies, comme Pro-Algues Marine et Organic Océans proposent déjà des produits fertilisants à base d'algues et Merinov collabore avec une entreprise privée en vue de développer de nouveaux procédés d'extraction à l'échelle semi-pilote.

La disponibilité des macroalgues et ses domaines d'application encore peu explorés sont les deux indicateurs que cette ressource possède un fort potentiel de valorisation. Actuellement utilisées pour leur source de nutriments et leurs propriétés biostimulantes [1–4], les macroalgues sont riches en phytohormones. Les phytohormones sont des composés biologiquement actifs produits par les plantes qui ont un rôle important dans la régulation de plusieurs processus physiologiques [5, 6]. Principalement, la classe des auxines sera étudiée dans ce projet. Les auxines et les cytokinines ont tous les deux un impact sur la croissance des végétaux favorisant par exemple la formation des racines, l'allongement de la tige et la croissance cellulaire de la plante.

Les macroalgues sont des algues pluricellulaires possédant un thalle. Les macroalgues sont classées selon trois classes : les algues brunes (*Phaeophyceae*), les algues rouges (*Rhodophyceae*) et les algues vertes (*Chlorophyceae*). Actuellement, les macroalgues sont peu exploitées pour leur composition en composés d'intérêt comme les phytohormones. En effet, dans la littérature, les phytohormones de plantes terrestres sont davantage étudiées comparativement aux phytohormones issues d'algues [5, 7].

Différentes méthodes de quantification ont été développées dernièrement passant par des tests enzymatiques, la colorimétrie, la chromatographie liquide et gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse de phytohormones. Peu d'articles documentent

les tests enzymatiques et colorimétriques sur les algues et ceux qui recensent les développements datent de plusieurs années [6], d'où l'intérêt porté à ce projet. L'introduction générale abordera différentes thématiques telles que les algues, les voies de valorisation de celles-ci, leurs compositions, les phytohormones et les méthodes littéraires d'extraction, de purification et d'analyse des composés actifs.

1. LES ALGUES

1.1 LE SAINT-LAURENT MARITIME

L'estuaire maritime et le golfe du Saint-Laurent forment le Saint-Laurent maritime. Ce vaste milieu marin s'étendant sur 400 km est principalement exploité pour le transport commercial, la pêche et pour des fins récréatives [8]. Ce grand réservoir renferme une grande variété de végétaux et d'animaux, passant par les plantes vasculaires marines, algues marines, mollusques, annélides, arthropodes, échinodermes, bryozoaires, cnidaires, éponges et poissons. Tous ayant une diversité qui leur est propre. Actuellement, on remarque un certain engouement pour les algues et différents projets de recherches sont menés par des centres d'expertise. La figure suivante illustre les différentes zones des différents inventaires de fucacées (*Fucaceae*) et de laminaires (*Laminaria*) au Québec.

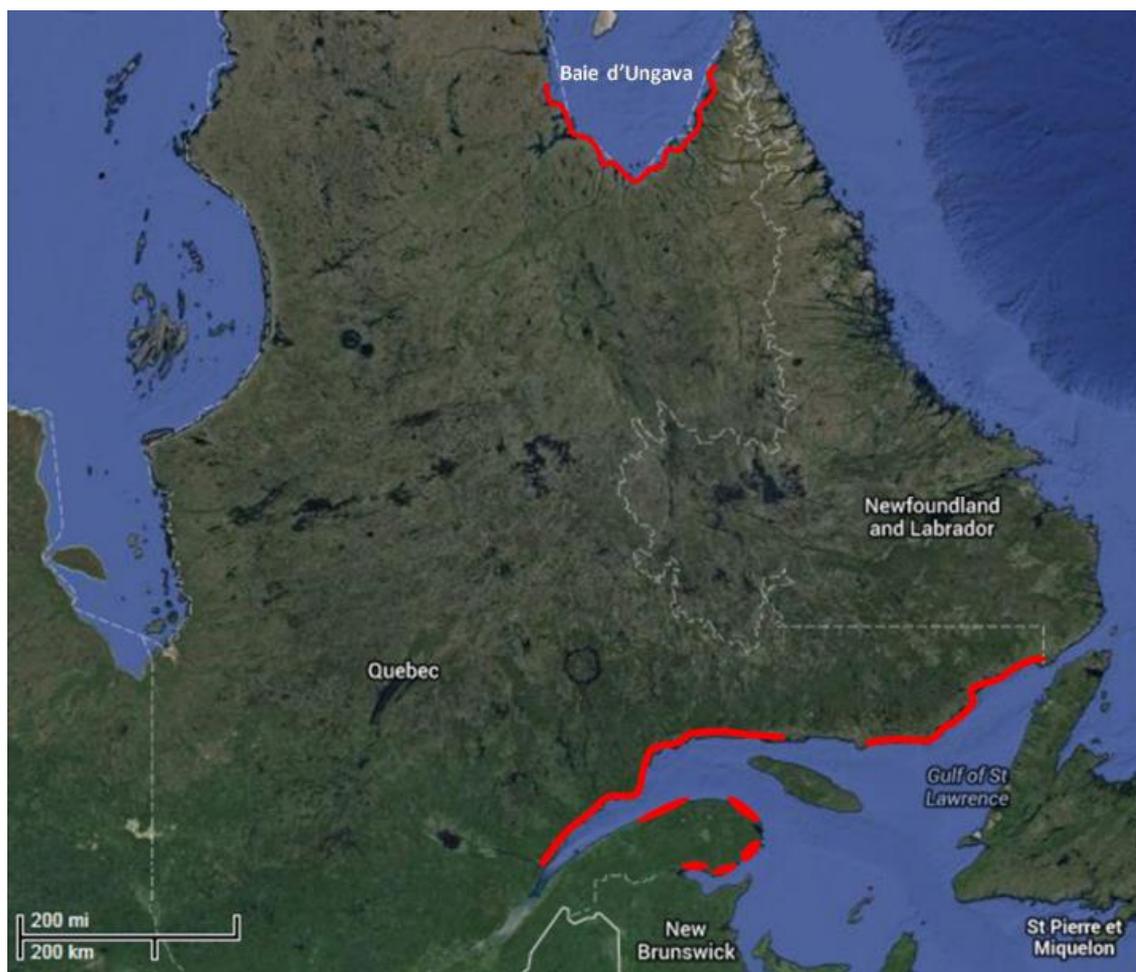


Figure 1 : Carte identifiant les zones des différents inventaires de fucacées et de laminaires ayant eu lieu au Québec [9]

Dernièrement, un effort a été effectué pour informatiser les données disponibles sur les herbiers d'algues du Québec. Comme mentionné dans le rapport de Lionard *et al*, 2014, il est possible de retrouver sur le site de l'Observatoire global du Saint-Laurent (OGSL), une carte interactive qui montre les différentes espèces étudiées (figure 2). Les différentes espèces répertoriées sont : agar criblé (*Agarum cribrosum*), alarie succulente (*Alaria esculenta*), ascophylle noueuse (*Ascophyllum nodosum*), fucus denté (*Fucus distichus edentatus*, *Fucus distichus distichus*), fucus évanescent (*Fucus distichus evanescens*), fucus spiralé (*Fucus spiralis*), fucus vésiculeux (*Fucus vesiculosus*), lacet de mer (*Chorda filum*), laminaires à long stipe (*Laminaria longicuris*, *Saccorhiza dermatodea*), laminaire digitée (*Laminaria digitata*), laminaire sp (*Laminaria*),

laminaires saccharines (*Saccharina latissima*, appelé auparavant *Laminaria saccharina*) et mousse d'Irlande (*Chondrus Crispus*). Pour simplifier la lecture, une fois nommée par leur nom commun, les algues seront dorénavant nommées seulement par leur nom en latin.

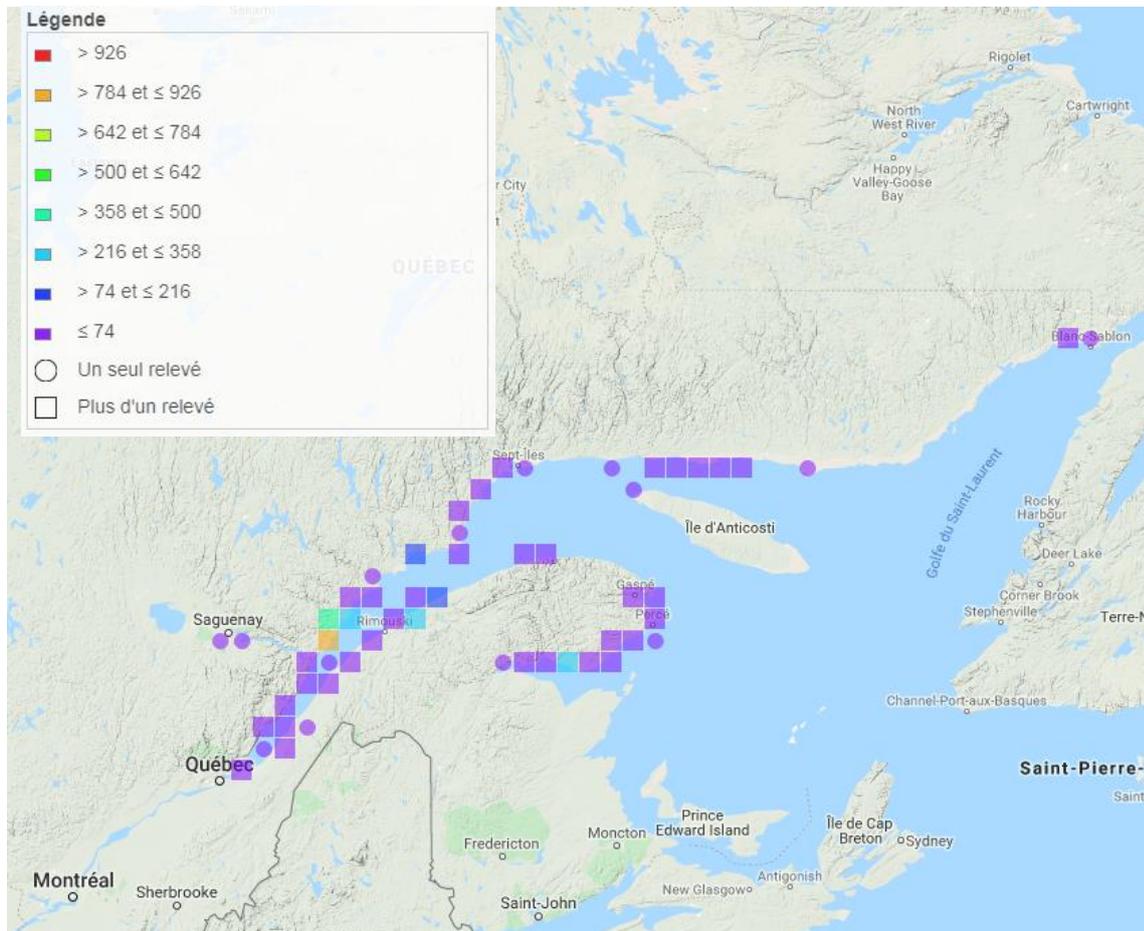


Figure 2 : Nombre de relevés d'algues répertoriés au Québec (données interactives disponibles sur le site de l'OGSL (<https://ogsl.ca/bio/>)) [10]

1.2 MARCHÉ DES ALGUES

En 2017, le marché commercial des algues est estimé mondialement à 13,07 milliards de dollars américains et est appelé à croître pour atteindre 21,11 milliards de dollars américains en 2023 [11]. Les algues créent un engouement à plusieurs niveaux. Les fabricants d'hydrocolloïdes, les fournisseurs d'algues comme matière première, les exportateurs et les importateurs de produits d'algues, les fournisseurs d'aliments pour

animaux, les fabricants de cosmétiques et les fabricants d'engrais sont les principales industries touchées par cette augmentation de l'intérêt pour les macroalgues [11].

Les macroalgues sont utilisées en agriculture sous forme d'extrait principalement pour leurs propriétés biostimulantes [4]. La demande pour cette application des macroalgues sera en croissance surtout dans le contexte d'une agriculture plus biologique, plus verte et dont les rendements doivent rester élevés. La taille de ce segment de marché est actuellement de plusieurs dizaines de millions de dollars [12]. Avec l'intérêt croissant pour l'utilisation des algues en agriculture et la recherche d'alternatives à l'utilisation d'engrais chimiques, ce marché est amené à connaître une croissance exponentielle au cours des prochaines années.

Au Québec, on compte environ 240 espèces d'algues, dont 83 espèces de *Pheophyceae*, 85 de *Rhodophyceae* et 72 de *Chlorophyceae*. Pour l'Est du Canada, le total des espèces est de 346, dont 128 de *Pheophyceae* et 128 de *Rhodophyceae* et 90 de *Chlorophyceae* (Cardinal, 1990) [8].

Les côtes de l'Est du Canada sont riches en *Pheophyceae* qui à plusieurs endroits forme des herbiers marins très denses. Ce sont surtout les espèces de l'ordre des Fucales (*Fucus* et *Ascophyllum*) et les Laminariales (*Laminaria* et *Alaria*) qui constituent la plus grande biomasse. Le Québec est une province riche en ressource maritime. Plusieurs zones qui ont été inventoriées en Gaspésie, sur la Côte-Nord et dans le Bas-St-Laurent montrent que les biomasses de *Pheophyceae* sont en quantité suffisante pour une exploitation commerciale et sont comparables aux provinces maritimes et à l'Europe [13].

L'information disponible sur les macroalgues concerne essentiellement les herbiers marins accessibles à pied à marée basse (*Fucus* et *Ascophyllum* de l'étage médiolittoral) tandis que les herbiers de *Laminaria* qui sont constamment submergés sont très peu documentés. Les efforts d'inventaire effectués jusqu'à présent sont principalement associés aux demandes de permis de récolte d'entreprises privées et se limitent aux zones de récolte envisagées. Toutefois, les informations disponibles indiquent qu'il y a des biomasses importantes d'algues exploitables au Québec. Elles sont estimées pour l'*Ascophyllum nodosum* à 7 000 t sur la rive sud de l'estuaire (6 localités), pour le *Fucus* à 1500 t sur la rive sud de l'estuaire et à 82 000 t au Nunavik (Payne Bay) [14], et pour

la *Laminaria* à 25 000 t dans la Baie-des-Chaleurs (New-Richmond-Paspébiac). Les efforts de recensement des herbiers d'algues présents dans les eaux québécoises se poursuivent. Malgré les contraintes climatiques qui limitent les zones de récolte utilisables, le Québec possède plusieurs atouts tels que l'étendue du territoire, la diversité des climats et une faible pollution. De ce fait, les ressources québécoises en algues suscitent l'intérêt des compagnies québécoises et étrangères.

La possibilité de produire des algues en culture a déjà été étudiée et soulève un point important qui permettrait d'assurer le renouvellement de la ressource [15]. Plusieurs projets sont conduits par Merinov dans l'objectif d'exploiter l'algoculture et de valoriser les extraits d'algues [16]. Merinov participe au développement de nouveaux produits à haute valeur ajoutée. Ce type d'implication est important pour les mariculteurs de la Côte-Nord, car ils sont loin des grands centres et cela leur permettrait de réduire le coût de transport [17]. Ainsi, les producteurs peuvent valoriser sur place leur produit afin d'augmenter leur revenu.

1.3 ESPÈCES MAJORITAIRES

Différentes caractéristiques sont utilisées ici pour différencier les classes d'algues, dont leur couleur, leur structure globale et certains critères de reproduction. D'autres caractéristiques peuvent être utilisées pour distinguer les algues comme les critères biochimiques, les aspects cellulaires, la diversité et les milieux où elles sont retrouvées, etc. Un intérêt particulier sera porté au *Pheoophyceae* et plus précisément aux laminaires et aux fucacées puisque ce sont des espèces abondantes sur les côtes au Québec [18]. Ainsi, c'est une ressource abondante et facilement accessible à marée basse [18].

1.3.1 Rhodophyceae

Les *Chlorophyta* et les *Rhodophyta* forment le groupe monophylétique des métabiontes [19]. La majorité des *Rhodophyceae* sont des algues marines multicellulaires et se développent sur un substrat. Elles se caractérisent par leur couleur unique due à la présence phycobilines [20]. Elles contiennent aussi de chlorophylle a, des caroténoïdes et des pigments comme la phycoérythrine. La particularité de reproduction des *Rhodophyceae* provient de sa reproduction qui a lieu en trois générations (1^{ère} génération :

gamétophyte haploïde, 2^e génération : carposporophyte et 3^e génération : tétrasporophyte) [19].

1.3.2 Chlorophyceae

Les *Chlorophyceae* sont les premiers organismes apparus sur la planète [19]. Ces algues se sont adaptées aux eaux douces et ont été dans la mesure de s'affranchir d'un milieu aquatique pour coloniser le sol. Elles se caractérisent par leur couleur qui se compose d'un mélange de chlorophylles a et b, de carotènes et de xanthophylles [20]. Ainsi, les *Clorobionta* englobent les *Chlorophyceae* et les végétaux terrestres.

1.3.3 Pheaophyceae

Le phylum des *Phaeophyceae* est constitué majoritairement d'organismes marins (99,7%). Les *Pheaophyceae* peuvent atteindre des longueurs de 20 m de long pour les grandes algues de l'espèce *Macrocystis pyrifera*, 2-4 m de long pour les algues épaisses ressemblant au cuir et 30-60 cm pour les plus petites espèces [21]. L'exploitation actuelle des algues est axée principalement sur les *Pheaophyceae*, car elles sont présentes en abondance sur nos côtes. On peut les distinguer par leur apparence et leur couleur caractéristique d'un mélange de chlorophylle a et c, de pigments et de fucoxanthines [20]. Les *Pheaophyceae* appartiennent à la «lignée brune» et sont des Straménopiles avec les Diatomées et les Chrysophytes [19]. La différence entre ces groupes étant que les deux derniers sont exclusivement monocellulaires alors que les algues brunes sont quasi exclusivement pluricellulaires et macroscopiques [19]. Les formes les plus primitives d'algues brunes sont filamenteuses (exemple : le genre *Ectocarpus*) et les formes les plus évoluées présentent une différenciation morphologique et biochimique du thalle (formé de trois parties distinctes : le crampon, le stipe et la fronde) qui est particulièrement prononcée pour trois ordres : les Laminariales, les Fucales et les Durvilléales [19]. Les algues brunes se rencontrent dans toutes les mers du monde, mais davantage dans les eaux tempérées et froides que dans les eaux chaudes, la principale exception étant la mer des sargasses [19]. Au Québec, les *Phaeophyceae* représentent la plus forte biomasse algale sur les côtes [9].

La classification des *Phaeophyceae* est principalement basée sur des critères de reproduction. Comme elles peuvent se reproduire avec ou sans alternance de générations, deux sous-ensembles peuvent être distingués. L'ordre des Fucales regroupe toutes les espèces qui se reproduisent sans alternance de génération, ces algues ne présentent qu'un seul stade diploïde avec des gamètes haploïdes ; il n'y a pas de gamétophytes et les Fucales constituent la classe des Cyclospores. Toutes les autres espèces se reproduisent avec alternance de génération (gamétophyte haploïde et sporophyte diploïde) et selon que celles-ci sont morphologiquement identiques ou différentes, on les qualifie d'isogénères ou d'hétérogénères [19].

1.3.3.1 Fucales (*Ascophyllum* et *Fucus*)

Les fucales font partie de la classe des *Phaeophyceae*. *Ascophyllum* et *Fucus* sont les principaux genres de la famille des fucacées (*Fucaceae*) et font partie de l'ordre des fucales [19]. Les *Fucaceae* représentent les algues les plus communes de l'hémisphère Nord [8].

L'*Ascophyllum nodosum* et la *Fucus vesiculosus* sont deux espèces présentes dans les eaux du Québec. Elles forment des peuplements denses dans les battures abritées ou peu exposées [8]. Une des applications de l'*A. nodosum* est l'utilisation comme engrais agricole dans les champs.

La *F. vesiculosus* possède un thalle divisé en lanières et se distingue par des proliférations près du pied. Elle est reconnue grâce à ses structures aérifères [8]. Cette espèce est récoltée commercialement dans la baie de Fundy [8]. Elle est majoritairement associée à l'*A. nodosum*. Laquelle représente la plus grande biomasse d'algue de la zone médiolittorale de l'est du Canada [8]. Elle est principalement récoltée dans les provinces maritimes, du côté de l'Atlantique pour en extraire des composés utilisés dans le domaine alimentaire comme l'algine. À cet endroit, la récolte atteint 25 000 tonnes par année, ce qui fait de celle-ci la récolte la plus importante de l'est du Canada [8].

1.3.3.2 Laminaires (*Alaria esculenta* et *Saccharina latissima*)

Les laminaires font partie de la classe des *Phaeophyceae* [19]. *Laminaria* est un genre attribué à la famille des *Laminariaceae* et fait partie de l'ordre des *Laminariales*. Dans l'ordre des *Laminariales*, on retrouve aussi la famille des *Alariaceae*. Les *Laminaria* sont récoltées et cultivées pour en extraire l'algine qui est une substance mucilagineuse. Dans les pays asiatiques, elles font partie de l'alimentation quotidienne. Dans le fleuve Saint-Laurent et sur la côte atlantique canadienne, la récolte et l'exploitation des *Laminaria* n'étaient pas une industrie développée, avant 2003 [8]. Depuis les dernières années, on remarque une augmentation du développement de cette industrie dans les provinces maritimes [9]. Dans son rapport, Lionard *et al*, 2014 présente bien l'intérêt de cette ressource qui entre progressivement sur le marché québécois.

Au Québec, les deux espèces majoritairement disponibles pour la récolte et l'exploitation commerciale sont l'*Alaria esculenta* et la *Saccharina latissima* qui sont de l'ordre des *Laminariales*. L'*A. esculenta* se reconnaît facilement par sa fronde brun doré munie d'une nervure médiane imposante. L'*A. esculenta* peut atteindre 2,5 mètres de longueur [8]. Elle est utilisée dans l'alimentation et souvent vendue séchée.

La *S. latissima* est une espèce d'algue sucrée qui contient une grande quantité de mannitol [8]. La *S. latissima* peut atteindre 3 mètres et se distingue par une fronde en forme de lame brun-jaunâtre [8].

La figure 3 illustre les différentes espèces de Fucales et de Laminaires retrouvées au Québec disponible pour la valorisation ; *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Saccharina latissima* et *Alaria esculenta*.

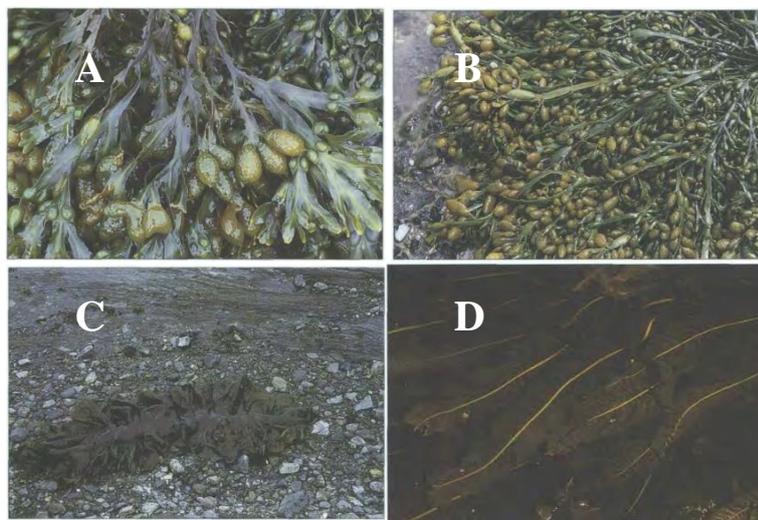


Figure 3 : Identification des macroalgues (A : *Fucus vesiculosus*, B : *Ascophyllum nodosum*, C : *Saccharina latissima*, D : *Alaria esculenta*) [8]

2. PRINCIPALES VOIES DE VALORISATION DES ALGUES

2.1 ALIMENTATION

2.1.1 Utilisation directe et indirecte dans l'alimentation humaine

La majeure partie de la production des algues est attribuée à l'alimentation humaine. Les pays asiatiques incorporent de façon quotidienne les algues laminaires dans leur alimentation [8]. L'intérêt pour les algues s'accroît depuis que celles-ci sont considérées comme un aliment santé ayant des propriétés nutritionnelles intéressantes [9]. Elles sont vendues sous forme séchée, en poudre ou en morceaux. Pour ce qui est de l'Atlantique canadien, l'intérêt pour la récolte est récent et l'industrie est en plein essor [22].

L'*A. esculenta* souvent utilisé dans l'alimentation et vendu majoritairement sous forme séchée [8]. La *S. latissima* est une algue sucrée qui contient une quantité significative de mannitol, ce qui la rend populaire auprès des consommateurs [8]. L'annexe 1 contient la fiche nutritionnelle pour la *S. latissima*. Cette espèce contient d'importantes quantités de glucides, lipides et de fibres.

Les algues font partie de l'alimentation humaine sous forme d'additif depuis plusieurs années [9]. Les *Phaeophyceae* sont couramment utilisées en alimentation comme matière première pour l'extraction des hydrocolloïdes et des alginates [21]. Les

hydrocolloïdes sont des composés hydrosolubles qui agissent comme agent de texture venant influencer la structure des produits de consommation. Les alginates sont plutôt reconnus pour être utilisés comme épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants de produits industriels.

2.1.2 Utilisation dans l'alimentation animale

En Europe, l'utilisation des algues dans l'alimentation animale est historiquement recensée. L'ajout d'une petite quantité d'algues dans l'alimentation a un impact positif sur la santé globale d'un animal [9]. Aujourd'hui, on remarque une diminution de cette voie d'utilisation due au coût élevé des algues. Cependant, son utilisation vient ajouter une valeur de revente au produit et est favorisée pour l'agriculture biologique [9].

2.2 AGRICULTURE

L'agriculture occupe aussi une grande partie de la valorisation des macroalgues. L'agriculture et les aliments biologiques sont en pleine expansion. De plus, les consommateurs recherchent de plus en plus des produits santé et ils sont soucieux de l'environnement. Les micro- et les macroalgues sont reconnus depuis longtemps pour augmenter la productivité des plantes et la production alimentaire [9, 12]. Une des principales fonctions des algues est la fertilisation des champs, due à leur abondance en minéraux et oligoéléments [3, 9]. Par ailleurs, au Québec, une des applications de l'*A. nodosum* est l'utilisation comme engrais agricole dans les champs [8]. L'annexe 1 et 2 montre l'abondance en différents éléments pour la *S. latissima* et la *F. serratus*, *vesiculosus*. Les algues ont des impacts multiples sur les végétaux; elles améliorent la germination, améliorent le développement des racines, ont un impact sur la qualité de la feuille, augmentent la résistance aux pathogènes et améliorent l'aspect général des végétaux [12]. Les effets positifs sont multiples. Plus particulièrement, les effets des phytohormones sur la plante sont abordés dans la section 4 de l'introduction.

2.3 AUTRES

Outre le secteur de l'alimentation et de l'agriculture, les algues sont utilisées dans différents domaines (figure 5). De plus, depuis les 30 dernières années, on remarque une

augmentation de l'intérêt porté pour cette ressource (figure 4). Par exemple, une voie possible de valorisation pourrait être l'incorporation d'algues séchées à un polymère pour y changer ses caractéristiques. Dans le secteur énergétique, on voit apparaître de plus en plus de biogaz de microalgues [9]. Les algues sont aussi utilisées comme crème anti-âge en cosmétique ou encore comme médicaments antiacides [23].

Figure 4 : Nombre d'articles scientifiques publiés sur les algues depuis les 30 dernières années (Source Web of Science; recherche faite le 30 mai 2019)

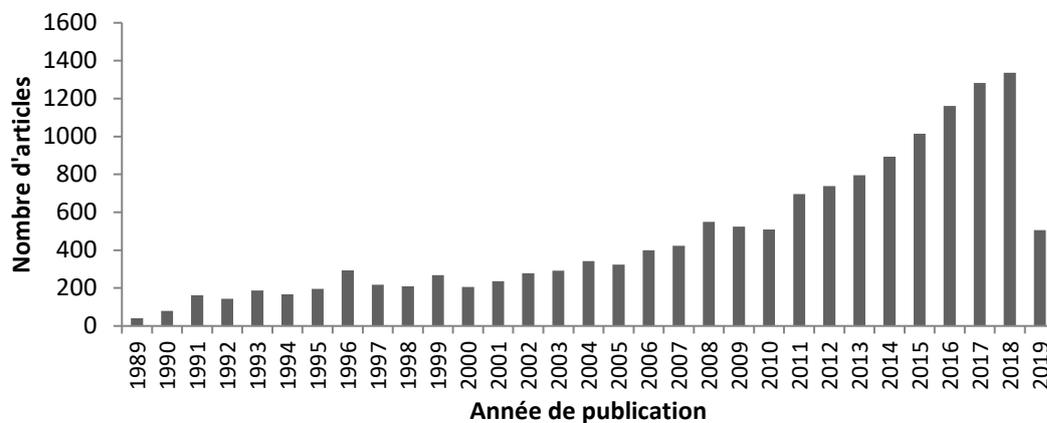
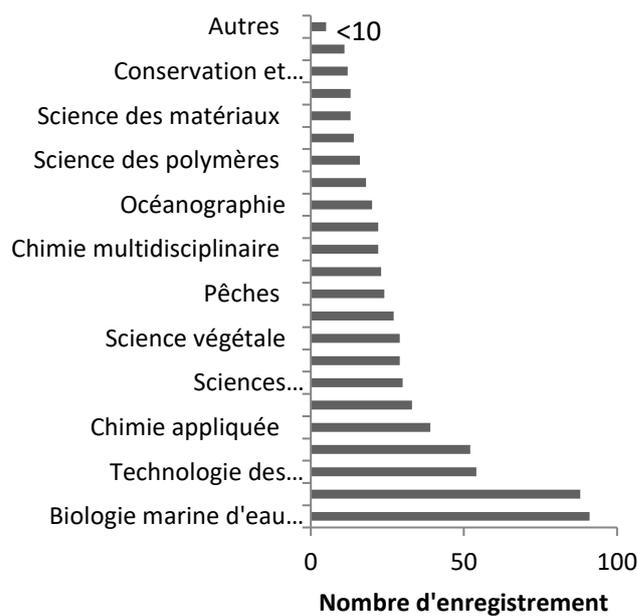


Figure 5: Tendances des recherches effectuées sur les algues en 2019 (Source Web of Science; recherche faite le 30 mai 2019)



3. COMPOSITION DES ALGUES

Les macroalgues sont composées de minéraux et d'un mélange complexe de biomolécules actives (polysaccharides, protéines, lipides, stérols, terpènes, pigments, composés phénoliques, quinones, hydroquinones, hydrocarbures volatils et vitamines) agissant à de nombreux niveaux sur les plantes. La composition des algues va varier selon les espèces, leur environnement et aussi selon leur stade de croissance [24, 25]. Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la composition des algues en métabolites primaires, mais ces méthodes ne sont pas standardisées [26]. Ce n'est pas non plus toutes les algues qui ont été étudiées à ce jour. Le travail de comparaison avec la littérature est donc plus ardu. L'article de Fiset *et al*, 2017 met en lumière les lacunes reliées au manque de standardisation des méthodes [26]. Tout de même, ce chapitre présente un portrait global du contenu des *Phaeophyceae*.

Principalement, les différentes classes de molécules peuvent se regrouper en minéraux (ex. éléments natifs, sulfures et dérivés, oxydes et hydroxydes, halogénures, carbonates et nitrate, borates, sulfates et dérivés, phosphate et dérivés, silicates et les minéraux organiques) et pour les molécules organiques, selon le type de métabolites : les métabolites primaires (essentiels pour la croissance et pour maintenir le fonctionnement de l'organisme) et les métabolites secondaires (souvent produits en phase subséquente de la croissance, ils améliorent la capacité globale des végétaux à survivre et à surmonter aux défis locaux [27]).

3.1 MINÉRAUX

Les minéraux sont essentiels pour l'homme, mais aussi pour la croissance des végétaux. Les *Phaeophyceae* sont riches en nutriments tels que le calcium, le magnésium, le potassium, le sodium, le phosphore, le soufre, l'iode, le fer, etc. [9, 25]. Les minéraux représentent généralement 10 à 35% de la masse sèche d'algues [25]. Les fiches nutritionnelles de la *S. latissima* et de la *F. serratus*, *vessiculosus* montrent une teneur moyenne en minéraux respectifs de 27,2 et de 19,4% de masse sèche (Annexes 1 et 2) [28, 29]. Ces deux espèces sont composées de quantités importantes de potassium et de calcium. Les nutriments contenus dans les algues, en plus de leur contenu en métabolites secondaires, contribuent à augmenter l'engouement pour les algues dans l'agriculture [4].

3.2 MÉTABOLITES PRIMAIRES

Les métabolites primaires sont des métabolites impliqués directement dans la croissance, le développement d'un organisme et sont essentiels à la survie de celui-ci. Les métabolites primaires contenus dans les algues comme les polysaccharides et les protéines permettent d'améliorer la santé générale et la performance des animaux lorsqu'ils sont ajoutés dans l'alimentation animale [18]. Il y a plusieurs autres applications possibles pour ces métabolites. Par exemple, l'alginate contenu dans les algues, lorsqu'utilisé dans le compost, assure une bonne structure des sols et réduit l'érosion [18].

3.2.1 Polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères de monosaccharides constitués de plusieurs unités répétitives liées par des liaisons osidiques. Ce sont les principaux composants des algues représentant plus de 60% de la masse sèche [25]. Dans le monde végétal, ces métabolites sont utilisés notamment pour la structure de l'organisme (ex. cellulose) et pour l'entreposage et le transport de l'énergie (ex. amidon). La cellulose est présente dans les *Pheophyceae* à des teneurs variant de 5,7 à 14% [25]. Les polysaccharides mucilagineux des *Pheophyceae* sont l'alginate (polymère lié β -1,4 de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-guluronique), le fucoïdane (polysaccharides sulfatés contenant majoritairement du fucose, mais également d'autres sucres comme le galactose, le mannose et le xylose, ainsi que des acides uroniques [19]) et le laminaran (polysaccharide de réserve originale de type β -glucane) [19, 25]. Le tableau suivant présente les quantités de polysaccharides selon les espèces. Spécifiquement, l'espèce *S. latissima* contient une quantité significative de mannitol [9] qui est un sucre réduit.

Tableau 1 : Polysaccharides contenus dans des *Phaeophyceae* [25]

Espèces	Laminaran	Alginate	Fibre brute*
<i>Laminaria japonica</i>	1,3	22,5	9,1
<i>L. angustata var. longissima</i>	1,4	27,2	12,8
<i>Kjellmaniella gyrate</i>	4,3	30,2	16,1
<i>Undaria pinnatifida</i>	0,6	22,7	15,2
<i>Anthrothammus bifisus</i>	0,7	16,6	6,8
<i>Elisenia bicyclis</i>	13,3	17,9	7,1
<i>Ecklonia kurome</i>	-	16,0	4,6
<i>Pelvetia wrighii</i>	1,6	25,0	17,1

*Fibre brute : Total des fibres insolubles ; composant glucidique non digestible

3.2.2 Protéines

La teneur en protéines dans les algues est plus constante et relativement élevée par rapport aux plantes. Généralement, la teneur est de 10 à 30%. Elle est de 15 à 25% dans les *Chlorophyceae*, de 5 à 15% dans les *Phaeophyceae* et de 15 à 30% dans les *Rhodophyceae* (tableau 2). Due aux facteurs environnementaux, la teneur en protéines est relativement faible en été et plus élevée en hiver [25]. Les fiches nutritionnelles de la *S. latissima* et de la *F. serratus, vessiculosus* montre une teneur moyenne en protéine respective de 10,3 et de 7,4% de la masse sèche (Annexes 1 et 2).

Tableau 2 : Contenu en protéines dans diverses algues marines utilisées dans l'industrie alimentaire [25]

Espèces	Contenu en protéines % de la masse sèche
<i>Palmaria palmata</i>	8-35
<i>Porphyra tenera</i>	33-47
<i>Ulva lactuca</i>	10-21
<i>Ulva pertusa</i>	20-26
<i>Laminaria digitata</i>	8-15
<i>Fucus species</i>	3-11
<i>Ascophyllum nodosum</i>	3-15

3.2.3 Lipides

Les lipides font partie des métabolites primaires. La teneur en lipides des algues est généralement inférieure à 4% de la masse sèche [25]. Une des exceptions est la *Sargassum*

kjellmaniamum qui en contient plus de 6% [25]. Dans un article récent de Fonseca *et al*, 2006, $4,27 \pm 0,56$ et $4,91 \pm 1,54$ g·kg⁻¹ de lipides ont été déterminés respectivement pour la *Gracilaria cervicornis* (*Rhodophyceae*) et la *Sargassum vulgare* (*Phaeophyceae*) [24]. Les lipides sont difficiles à quantifier dans les algues et la teneur en lipide va être fortement influencée par les conditions environnementales. Trois catégories de lipides et d'acides gras sont toujours présentes dans les algues : monogalactosyldiacylglycerol, digalactosyldiacylglycerol et sulfoquinovosyl diacylglycerols [19]. Les lipides des algues contiennent souvent des antioxydants tels que le tocophérol [25]. Les fiches nutritionnelles de la *S. latissima* et de la *F. serratus*, *vessiculosus* montre une teneur moyenne de lipides respective de 1,1 et de 1,3% de masse sèche (Annexes 1 et 2).

3.2.3.1 Stérols

Les stérols font partie d'une sous-classe des lipides. Les stérols sont des lipides possédant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. Comme pour les *Rhodophyceae*, la composition en stérols des *Phaeophyceae* est particulièrement simple et se résume en général au fucostérol qui est toujours majoritaire [25].

3.3 MÉTABOLITES SECONDAIRES

Les métabolites secondaires sont impliqués dans le développement spécifique des caractéristiques des végétaux et des algues. Indispensables à la plante et aux algues, ils veillent au bon développement et à la croissance de celle-ci. Les algues contiennent plusieurs métabolites indispensables aux plantes favorisant certaines activités biologiques. Ils sont souvent retrouvés en faible quantité. À ce jour, un intérêt est toujours porté pour l'identification de nouveaux composés.

3.3.1 Terpènes

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures produits par les plantes en particulier par les agrumes, plantes herbacées, etc. Les terpènes sont formés à partir d'unités isoprènes. On retrouve un certain nombre de composés qui se différencie en fonction du nombre n (entier) d'unités pentacarbonées (en C₅) ramifiées. Les sesquiterpènes sont

composés de trois unités isopréniques. Les sesquiterpènes des *Dictyotales* (*Dictyotales* : rang taxinomique d'algues brunes marines de la classe des *Phaeophyceae*) sont des molécules simples ; hydrocarbure, alcools, cétones, esters, etc. pour la plupart déjà connus dans le milieu terrestre [19]. Les diterpènes sont composés de quatre unités d'isoprène. Il est possible de les regrouper en trois familles : germacrane, xénicane et dolabellane.

La famille des tétraterpènes englobe aussi les caroténoïdes et les xanthophylles. La composition en carotènes dans les algues brunes se limite au β -carotène de telle sorte que le rapport α/β est proche de 0 [19]. La fiche nutritionnelle de la *F. serratus*, *vessiculosus* montre une teneur moyenne de β -carotène de 12 mg/100 g de masse sèche (Annexe 2).

Pour ce qui est des xanthophylles, on retrouve la fucoxanthine qui est plus abondante que la violaxanthine [19]. Les *Chlorophyceae* contiennent des xanthophylles, cette caractéristique permet de les distinguer.

3.3.2 Pigments

La couleur des algues provient des pigments photosynthétiques. Comme pour tous les organismes de la lignée brune, les *Phaeophyceae* possèdent les chlorophylles a, c1 et c2. Les *Phaeophyceae* possèdent aussi des pigments comme des fucoxanthines [20]. Les *Chlorophyceae* se caractérisent par leur couleur qui se compose d'un mélange de chlorophylles a et b, de carotènes et de xanthophylles [20]. Les *Rhodophyceae* se caractérisent par leur couleur unique due à la présence phycobilines [20]. Elles contiennent aussi de chlorophylle a, des caroténoïdes et des pigments comme la phycoérythrine.

3.3.3 Composés phénoliques

Les métabolites secondaires de types phénol englobent plusieurs types de composés (figure 6). La présence de dérivés phénoliques, oligophénols et polyphénols, avec ou sans halogène est une des caractéristiques des *Phaeophyceae* [19]. Relativement peu de composés phénoliques ont été identifiés et étudiés. Il s'agit principalement des flavonones, flavonols, anthocyanes et des tanins [25]. Les composés phénoliques ont une forte activité antioxydante et certains peuvent se lier aux protéines et inhiber l'activité

enzymatique [25]. Ainsi, ce sont des molécules de défenses. Les isoflavonoïdes sont les phytoalexines prédominantes dans la famille des légumineuses, mais d'autres familles comme les solanacées semblent utiliser des dérivés terpéniques pour se défendre [30]. Les *phaeophyceae* sont particulièrement riches en polyphénols ; des molécules prometteuses pour la prévention et le traitement du cancer [18].

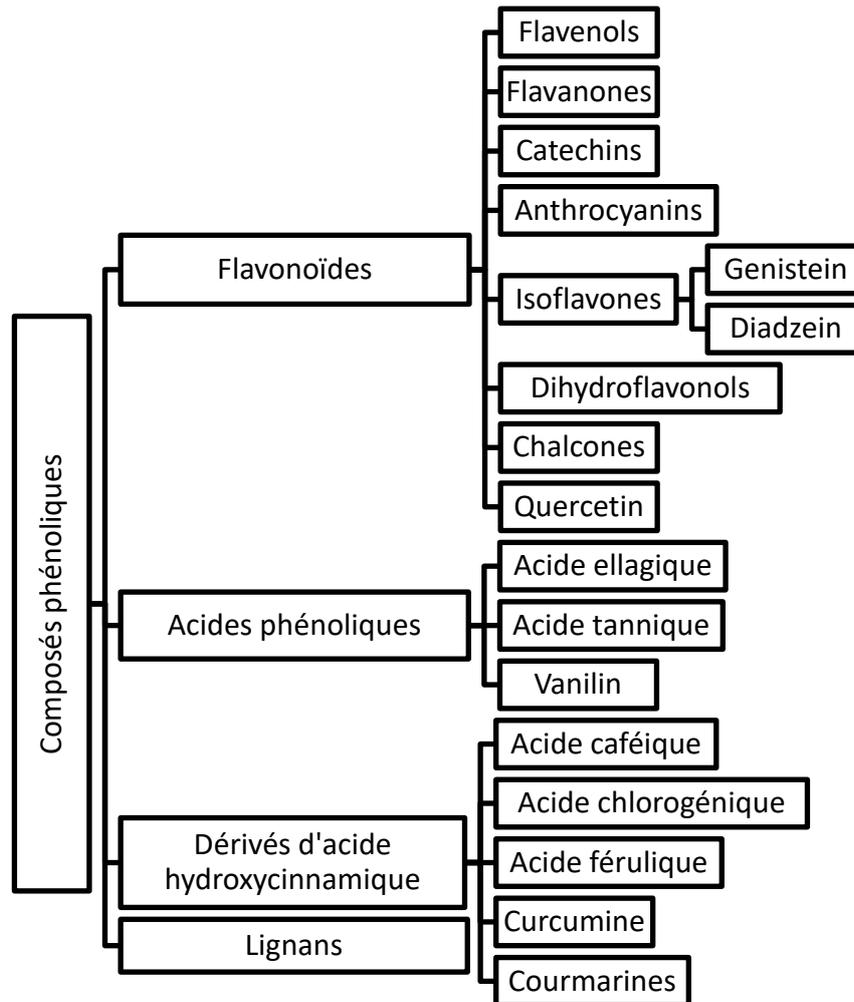


Figure 6 : Nomenclature de certains des composés phénoliques d'origine naturelle [25].

3.3.4 Oxylipines

Les oxylipines constituent une famille de produits naturels oxygénés qui sont formés à partir d'acides gras par des voies impliquant au moins une étape d'oxydation

dépendante du dioxygène. Les oxylipines sont globalement les dérivés de l'acide arachidonique et de l'acide stéaridonique [19].

3.3.5 Quinones

Les quinones sont composées de plusieurs diènes. Les quinones sont des composés organiques dérivés des composés aromatiques. Le modèle de base des molécules de ce groupe est le 1,4-benzoquinone. Les dérivés des quinones sont souvent présentés dans les molécules bioactives.

3.3.6 Hydroquinones

Les hydroquinones sont des composés organiques aromatiques. Ce sont des agents réducteurs. Leur structure est caractérisée par deux groupes hydroxyles en position *para* sur un phényle.

3.3.7 Hydrocarbures volatils

Les hydrocarbures volatils sont des substances qui sont émises par toutes les espèces de *Phaeophyceae* et ne sont pas spécifiques d'un ordre ou d'une famille.

3.3.8 Vitamines

Les algues contiennent des vitamines. Les vitamines sont des substances organiques nécessaires en faibles quantités au métabolisme d'un organisme vivant. Généralement, une des particularités des algues est la présence de vitamine B12 qui est habituellement rare dans les légumes [25]. Elles ont aussi des quantités de vitamines E et C qui vont varier dépendamment des conditions environnementales et de la saison d'échantillonnage [25].

Pour ce qui est de la *S. latissima* et de la *F. serratus vesiculus*, les vitamines qui sont en abondance sont respectivement la C, B2, A, E, B1 et D pour la première et B8, E et B3 pour la seconde [28, 29] comme montré aux annexes 1 et 2.

3.3.9 Les phytohormones

Les phytohormones sont des métabolites secondaires. La quantité de phytohormones et de leurs dérivés dans les tissus des plantes est relativement faible (généralement à des niveaux du $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Ces molécules présentent des effets importants sur la germination, la croissance, la résistance aux stress et le rendement des plantes cultivées [7]. De plus, elles améliorent l'efficacité des fertilisants classiques de type azote, phosphore et potassium (NPK) [21], diminuant ainsi leur utilisation et les impacts environnementaux. Les phytohormones seront abordées avec plus de détails dans la partie 4 de la revue de la littérature.

4. LES PHYTOHORMONES

Le terme phytohormone a d'abord été introduit par Thimann en 1948 qui a décrit les phytohormones comme étant : « [...] *une substance qui, produite dans une région déterminée d'un organe végétal, serait transportée dans une autre région pour y contrôler, régler ou encore déclencher un processus physiologique déterminé.* » [31]. Les hormones sont des stimulants moléculaires qui sont produits en petite quantité dans une partie d'un organisme et transportés dans d'autres parties pour déclencher des réactions dans les cellules et les tissus en se liant à un récepteur précis [32]. Les hormones végétales et les substances de croissance des plantes jouent un rôle important dans le contrôle de la croissance et du développement de l'organisme végétal. En d'autres mots, les hormones sont des messagers chimiques qui sont produits dans une cellule et qui modulent les processus cellulaires dans d'autres cellules par interaction avec des protéines spécifiques qui ont pour fonctions de lier les voies de transduction cellulaire [33]. Le développement de la plante est régulé principalement par 10 types d'hormones majoritaires.

Les phytohormones sont des composés biologiquement actifs de faibles masses moléculaires produits par les végétaux et sont impliquées dans leurs réseaux de signalisation. Plus précisément, elles participent à la régulation du métabolisme et de la croissance des végétaux dans des conditions environnementales défavorables, dont le stress abiotique (chocs de température, salinité, apport insuffisant en nutriment, rayonnement solaire, etc.) et le stress biotique (maladies, insectes, bactéries) [34]. Plusieurs évidences suggèrent que plusieurs phytohormones agissent souvent comme

intermédiaire pour le même processus biologique par des actions additives, synergiques ou antagonistes conduisant à un réseau complexe de signaux.

Les phytohormones de croissance sont des composés organiques, d'origine végétale, formés dans une zone déterminée de la plante, assurant, en concentration extrêmement faible, la régulation des processus de croissance et en particulier de l'élongation cellulaire [31]. Généralement, les phytohormones sont difficiles à détecter, car elles sont présentes en faible quantité. Il faut donc des méthodes spécifiques et précises pour les identifier. Ces méthodes sont coûteuses. Il existe peu de méthodes simples qui ne nécessitent pas d'appareils dispendieux pour les détecter. Majoritairement, toutes les phytohormones connues ont été détectées dans plusieurs taxons d'algues [5]. Au meilleur de ma connaissance, il n'y a pas eu d'identification dans les espèces qu'on retrouve au Québec.

4.1 CLASSES DES PHYTOHORMONES

Ces phytohormones sont catégorisées à l'intérieur de plusieurs classes dont les auxines, brassinostéroïdes (BR), cytokinines (CTK), éthylènes, gibbérellines (GA), phytoalexines (PA), strigolactones (St), l'acide abscissique (ABA), jasmonique (JA) et salicylique (SA) [5, 33, 35].

4.1.1 Auxines

La première phytohormone découverte et étudiée est l'auxine [36]. Ces substances sont toutes de nature indolique (composé organique aromatique hétérocyclique) [31]. Les auxines sont des acides indoliques distinguables par la chaîne qu'ils possèdent. La figure 7 illustre différents composés de la classe des auxines.

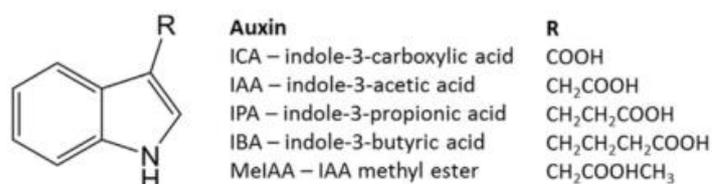


Figure 7 : Structure chimique des auxines [36,37].

Les auxines stimulent l'allongement de la tige (en faible concentration seulement), favorisent la formation des racines latérales et adventives, régulent la formation des fruits, augmentent la dominance apicale, jouent un rôle dans le phototropisme et le gravitropisme, favorisent la différenciation vasculaire et retardent d'abscission des feuilles [32].

En général, les auxines sont définies comme étant des composés avec une activité biologique similaire à l'acide indole-acétique (IAA) incluant la capacité de promouvoir l'allongement cellulaire dans les sections de coléoptile (coléoptile : organe transitoire lors de la germination formant une gaine protectrice pointue autour des pousses émergentes chez les monocotylédones tel que les graminées) et de tige, la division cellulaire dans les cultures de cals (cal : structure de prolifération cellulaire obtenue notamment en culture *in vitro* par l'ajout d'hormones végétales) en présence de cytokinines, la formation de racines adventives sur les feuilles et les tiges détachées, et d'autres phénomènes de développement associés à l'action de l'IAA [33].

Les précurseurs auxiniques sont des composés qui, *in vivo*, peuvent assurer la formation d'auxines. Ils ne sont pas nécessairement actifs sur la croissance, mais il est difficile, dans certain cas, de distinguer entre une auxine et un précurseur qui serait actif par lui-même [31]. Tandis que les effecteurs auxiniques sont des substances qui agissent dans le sens d'une modification de l'effet qu'exercent, sur la croissance, les hormones et les substances de croissance. Ces composés peuvent se comporter comme antagonistes ou en synergistes, selon qu'ils opposent ou qu'ils renforcent l'action des hormones ou des substances de croissance [31].

Les auxines sont aussi définies comme étant des phytohormones de croissance et correspondent à une classe de composés dont l'acide β -indolyl-acétique doit être considéré comme le représentant le plus important. Au milieu des années 1930, l'indole-3-acétique (IAA) fut déterminé comme étant la principale auxine [33]. D'autres auxines ont été découvertes par la suite, mais IAA est de loin la plus abondante et importante au niveau physiologique. Puisque sa structure est relativement simple, plusieurs laboratoires ont été en mesure de la synthétiser et de déterminer l'activité associée à cette auxine.

4.1.2 Brassinostéroïdes (BR)

Les brassinostéroïdes (BR) sont un groupe de composés ressemblant aux stéroïdes. La famille des BR est constituée de brassinolide (BL) et d'environ 40 autres BR libres et conjugués [36]. La figure 8 présente différents exemples de structures de BR retrouvés dans les végétaux.

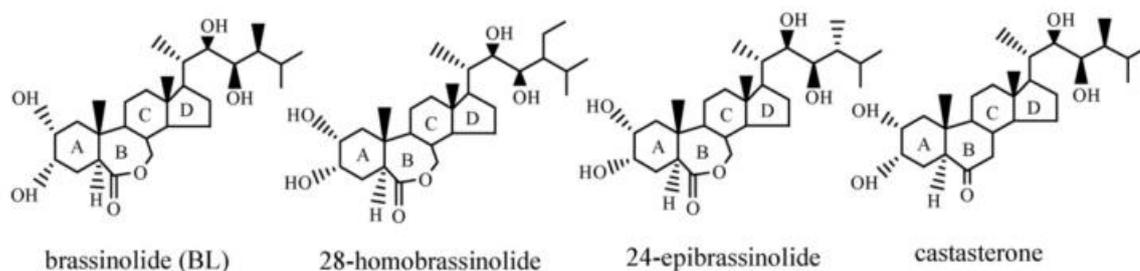


Figure 8 : Structures de brassinostéroïdes retrouvés dans les plantes [36].

Ils favorisent l'expansion et la division cellulaires dans les pousses, favorisent la croissance des racines à de faibles concentrations, inhibent la croissance des racines à des concentrations élevées, favorisent la différenciation du xylème et inhibent la différenciation du phloème et favorisent la germination des graines et l'allongement des tubes polliniques [32].

4.1.3 Cytokinines (CTK)

La structure des cytokinines se rapproche des bases puriques (adénines substituées). Les cytokinines naturelles sont des dérivés d'adénine [36], comme le montre la figure 9, portant une chaîne latérale isopénoïde (zéatine, dihydrozéine, isopentényladénine) ou aromatique (kinétine, benzyladénine, topoline) [38]. Les phénylurées (thidiazuron) et autres sont des cytokinines synthétiques. La figure 10 présente les principales cytokinines retrouvées dans les plantes.

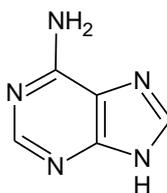


Figure 9 : Structure chimique de l'adénine

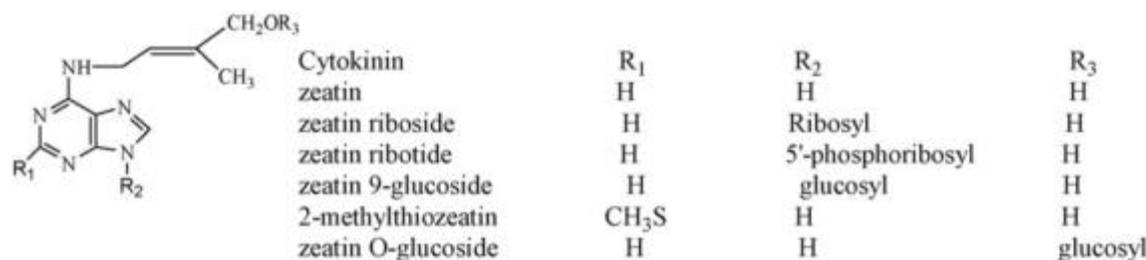


Figure 10 : Principales cytokinines retrouvées dans les plantes [36]

Les auxines et les cytokinines sont des hormones régulatrices de la croissance des plantes, impliquées dans l'augmentation du rendement de croissance et dans le développement racinaire [7, 39]. Les cytokinines régulent la division cellulaire dans les pousses et les racines, modifient la dominance apicale et favorisent la croissance de bourgeons latéraux, favorisent le déplacement des nutriments dans les tissus cibles, stimulent la germination des graines et retardent la sénescence [32]. Les cytokinines induisent la division cellulaire, et ce, en présence d'auxines [38].

Les cytokinines sont définies comme étant des composés qui ont des activités biologiques similaires aux *trans*-Zéatine. Ces activités incluent la division cellulaire dans les cellules de calus en présence d'auxine, favorisent la formation du bourgeon ou des racines des cultures de calus quand le ratio molaire d'auxine est approprié, retardent la sénescence des feuilles et favorisent l'extension des cotylédons [33].

4.1.4 Éthylène

L'éthylène est un hydrocarbure insaturé. Sa formule brute est représentée à la figure 11.

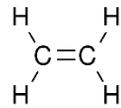


Figure 11 : Structure de l'éthylène

L'éthylène favorise la maturation de nombreux fruits, l'abscission des feuilles et la triple réponse dans les plantules (inhibition de l'allongement des tiges, promotion de l'expansion latérale et croissance horizontale), augmente la vitesse de sénescence, favorise la formation des racines et des poils absorbants et favorise la floraison dans la famille des ananas (les broméliacées) [32].

4.1.5 Gibbérellines (GA)

Chimiquement, tous les GAs connus sont des analogues de l'acide gibbérellique [36], tel que montré à la figure 12. L'acide gibbérellique et ses dérivés font parties d'une vaste famille d'acides diterpénique de 125 membres [40], dont certains ont illustrés à la figure 13. Les Gas de cette figure sont numérotés dans l'ordre de leur identification [40].

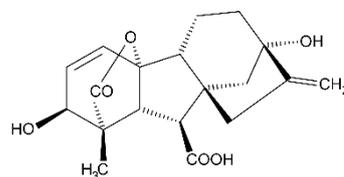


Figure 12 : Acide gibbérellique ou GA₃

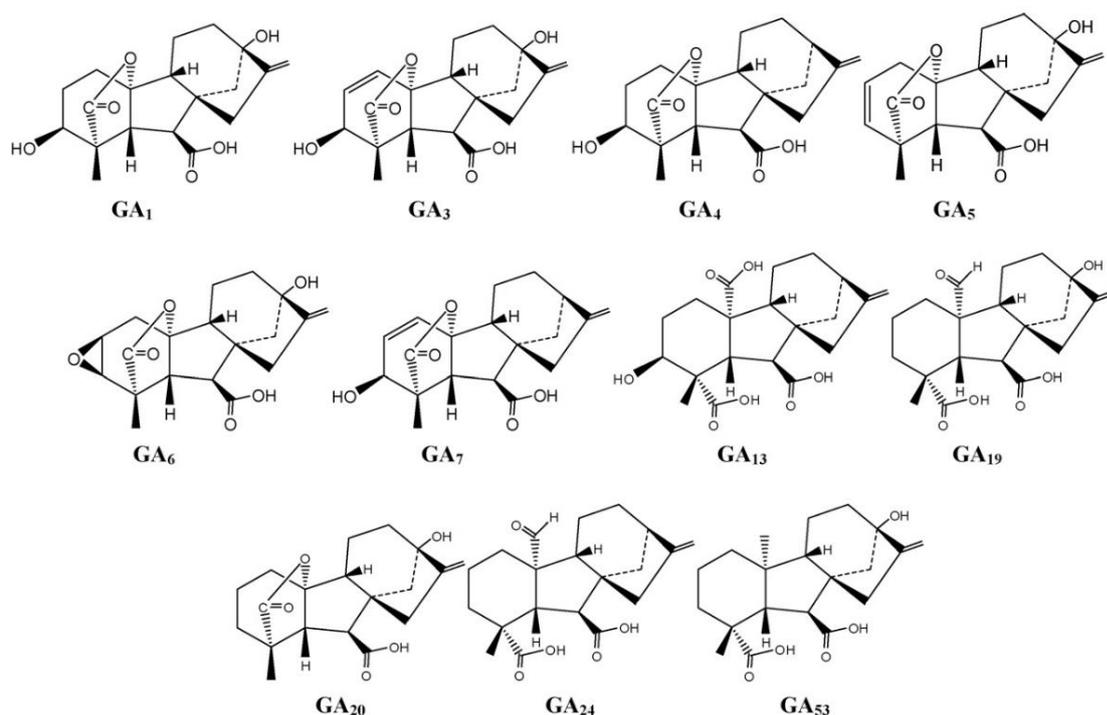


Figure 13 : Structures et abréviations de quelques gibbérellines [40].

Les gibbérellines stimulent l'allongement des tiges, la formation du pollen, la croissance des tubes polliniques, la fructification, ainsi que la formation et la germination des graines, régulent la détermination du sexe et la transition de la phase juvénile à la phase adulte [32, 36, 40].

4.1.6 Phytoalexines (PA)

Les phytoalexines représentent une classe de biomolécules basée sur leurs bioactivités qui inclut de nombreux composés phénoliques, des polyacétylènes, terpénoïdes et alcaloïdes [41]. Cette classe de composés se définit comme des composés chimiquement diversifiés, antimicrobiens [30, 42], de faibles masses moléculaires qui sont produits, synthétisés et accumulés proche d'un site d'infection [33, 42], en réponse à des stress biotiques et abiotiques [41, 42]. Les PA agissent aussi comme stimulants des symbioses de mycorhize [43].

4.1.7 Strigolactones (St)

Les St sont un groupe de lactones terpénoïdes [38]. Plus de 14 St ont été identifiés à partir de sources naturelles (figure 14).

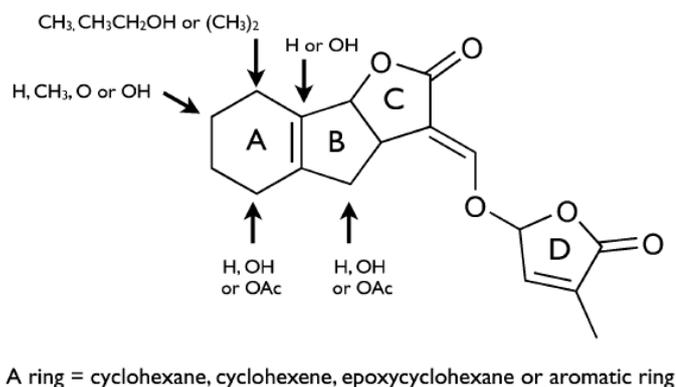


Figure 14 : Structure des strigolactones avec différents éléments structuraux possibles [44].

Les St sont des stimulants de la germination des graines qui favorisent également la régulation de la dominance apicale et l'attraction de champignons mycorhiziens vers les racines [32]. Les St sont des dérivés qui agissent dans la communication de la rhizosphère des plantes avec les mycorhizes [38].

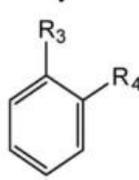
4.1.8 Acides abscissiques (ABA)

L'acide abscissique (ABA) est un acide sesquiterpénoïde à 15 atomes de carbone apparenté à une molécule de carotène [38].

Aussi connus sous le nom d'oxylipine, les acides jasmoniques sont synthétisés à partir d'acides gras polyinsaturés et participent au développement des réponses défensives [5].

4.1.10 Acide salicylique (SA)

L'acide salicylique est un composé organique aromatique. Il possède un noyau benzénique substitué par un groupe carboxyle et un groupe hydroxyle en position ortho.



Salicylate-related compounds	R ₃	R ₄
salicylic acid (SA)	COOH	OH
salicylic acid methyl ester (MeSA)	COOCH ₃	OH
benzoic acid (BA)	COOH	H
benzoic acid methyl ester (MeBA)	COOCH ₃	H
cinnamic acid (CA)	CH=CHCOOH	H
cinnamic acid (MeCA)	CH=CHCOOCH ₃	H

Figure 17 : Structures des salicylates retrouvés dans les végétaux [36]

L'acide salicylique est impliqué dans la production d'un type de protéines et est utilisé pour résister à l'attaque des agents pathogènes [32].

4.1.11 Résumé des principales fonctions associées aux phytohormones

Le tableau suivant résume les principales fonctions associées aux phytohormones.

Tableau 3 : Principales fonctions associées aux phytohormones [5]

Nom	Voie de biosynthèse	Emplacement de synthèse	Activité physiologique de base
Auxines	Du tryptophane et de l'indole	Primordia des feuilles, jeunes feuilles et fruits en développement	Induction de la croissance d'allongement; différenciation des éléments du phloème; dominance apicale; tropismes; initiation de la formation des racines; etc.
ABA	Des caroténoïdes	Racines et feuilles expansées	Contrôle de la fonction de l'appareil stomatique; inhibition de la croissance; dormance des graines
Brassinostéroïdes	De l'acide mévalonique	Tissus divers	Contrôle de la division, croissance par allongement, différenciation du système vasculaire
Cytokinines	Modification biochimique de l'adénine	Pointes racinaires, jeunes feuilles et graines en développement	Contrôle de la division cellulaire; développement des bourgeons; le développement de la lame de la feuille; retard de sénescence
Éthylène	Du méthionine	Tissus stressés et fruits mûrs	Induction de la sénescence; initiation de réponses défensives
Gibbérellines	Du glycéraldéhydes-3-phosphate	Jeunes tissus des pousses et graines en développement	Allongement de la tige; initiation de la germination des graines
Jasmonides	Des acides gras insaturés	Tissus divers	Développement de réponses défensives
Polyamines	Par décarboxylation de l'arginine ou de l'ornithine	Tissus divers	Régulation de la croissance et du développement aux concentrations micromolaires
Peptides signal	Des acides aminés	Tissus divers	Initiation de réponses défensives; identification de l'auto-incompatibilité
Salicylates	Du phénylalanine	Tissus divers	Induction du complexe de réponses défensives au cours de la pathogénèse

5. MÉTHODES DE PRÉPARATION, D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES PHYTOHORMONES ISSUES DE LA LITTÉRATURE

Dans cette section, différentes méthodes d'extractions et de purification sont présentées. Il est difficile de comparer les méthodes d'analyses des phytohormones des algues entre elles, car les méthodes ne sont pas standardisées. Pour cette raison, un survol des méthodes est effectué.

5.1 Prétraitement des algues

L'étape d'échantillonnage est une étape cruciale. Généralement, les algues doivent être cueillies rapidement et congelées pour éviter la dégradation des composés d'intérêt. Par exemple, dans l'article de Portirio *et al*, 2016, les échantillons sont d'abord congelés sur le lieu d'échantillonnage dans de l'azote liquide [37].

L'augmentation de la surface de contact est une étape importante du prétraitement des échantillons. Le broyage peut-être fait dans de l'azote liquide pour éviter la dégradation chimique éventuelle des auxines [37]. Ce type de broyage a été utilisé pour la préparation d'extrait d'algues (*Bifurcaria brassicaeformis*, *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida*, *Macrocystis angustifolia*, *Splachnidium rugosum*, *Dictyota sp.*, *Sargassum heterophyllum*) dans l'article de Stirk *et al*, 2003 [45]. Wang *et al*, 2014 propose aussi un broyage à billes à petite échelle pour les algues *Pyropia haitanensis* et *Laminaria japonica* congelés pour l'extraction [46]. D'autres articles proposent aussi de traiter la matrice en la congelant et en la déshydratant (lyophilisation ou séchage) [47, 48].

5.2 Extraction des composés actifs

Plusieurs phytohormones peuvent s'hydrolyser ou se dégrader due à leur sensibilité aux environnements alcalins, ce qui est le cas de l'ester glucosyle de l'acide abscissique. Donc, il est important de choisir des méthodes d'extraction adéquates. Le choix d'une méthode d'extraction est aussi important, car elle permet de concentrer les phytohormones, de simplifier la matrice et de diminuer la quantité de sel, ce qui augmentera la précision des résultats [37].

5.2.1 Choix du solvant d'extraction

Le solvant d'extraction est important, car il permet de choisir les types de composés qui seront extraits. Par exemple, dans l'article de Stirk *et al*, 2003 [39], l'extraction des cytokinines a été effectuée avec de l'éthanol froid à 70%.

Les auxines sont légèrement solubles dans l'eau, et très solubles dans des solvants organiques (par exemple le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'éther diéthylique et le diméthylsulfoxyde) ou dans des solutions aqueuses alcalines telles que des tampons basiques [37]. Wang *et al*, 2014 utilise un mélange de méthanol, d'acide formique et d'eau pour extraire l'IAA, ABA, PAA, SA, GA3, JA, IPA de *Laminaria japonica* et *Pyropia haitanensis* [46]. Un mélange de méthanol et d'acide chlorhydrique a été utilisé pour extraire l'IAA et IBA dans l'article de Guo *et al*, 2010 [47]. Du méthanol 80% jumelé à un antioxydant a été utilisé lors de l'extraction de phytohormones acides et alcalines dans des tissus de plante dans l'article de Liu *et al*, 2013 [48]. Cao *et al*, 2016 propose une méthode d'extraction qui a permis de quantifier 43 phytohormones du riz [49]. L'extraction par macération est effectuée à 4°C pendant une nuit dans du méthanol à 80%. Des méthodes non conventionnelles telles l'extraction par fluide supercritique avec du CO₂ ont aussi démontré leur efficacité pour l'extraction de IAA, PAA, tZ, dans un mélange d'algues de la mer baltique et pour la *Cladophora glomerata* [50].

5.2.2 Extraction par macération

La technique de macération est une technique d'extraction solide-liquide. La biomasse est mise en contact avec un solvant (organique ou inorganique) et parfois agitée, refroidie, chauffée, etc. Adapté pour les extractions à l'échelle laboratoire, la macération est un processus peu coûteux et de faible coût [27]. C'est une technique douce, mais qui ne permet pas une extraction exhaustive.

5.2.3 Extraction au Soxhlet

L'extraction avec un extracteur Soxhlet a été largement étudiée pour l'extraction des composés d'origine naturelle [27]. Habituellement, une petite quantité d'échantillons est placée dans une cartouche qui est ensuite installée dans le porte-cartouche au-dessus

d'un ballon à distiller contenant le solvant ayant une affinité particulière pour le composé à extraire [27]. Le solvant est distillé et s'accumule dans le porte-cartouche jusqu'à ce que celui-ci soit plein et que la solution soit aspirée vers le ballon. Ce cycle se répète plusieurs fois lors d'une extraction au Soxhlet [27].

5.2.4 Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation se distingue par trois types: la distillation d'eau, la distillation d'eau et de vapeur et la distillation directe à la vapeur [27]. L'hydrodistillation implique trois processus physicochimiques principaux; hydrodiffusion, hydrolyse et décomposition à la chaleur [27]. Elle permet d'extraire des composés volatils.

5.2.5 Extraction assistée par ultrasons (UAE)

Les ultrasons, par le phénomène de cavitation qu'il engendre, induisent des effets mécaniques et chimiques permettant de casser des cellules animales ou végétales [51]. L'UAE est une technique d'extraction qui respecte les principes de la chimie verte et qui est de plus en plus utilisée, car elle permet d'augmenter l'insertion du solvant dans la biomasse.

5.2.6 Extraction par micro-ondes (MAE)

L'extraction par micro-ondes sous vide (VMAE) est utilisée dans le cas d'extraction de composés naturels. Le principal avantage de MAE réside dans les performances de la source de chaleur [52]. Les températures engendrées réduisent considérablement le temps d'extraction et le volume de solvant requis [52]. L'utilisation de la VMAE permet d'empêcher l'oxydation des analytes, mais permet aussi d'extraire à basse température, ce qui empêche la dégradation thermique associée à une extraction traditionnelle aux micro-ondes [37].

5.2.7 Extraction par solvant accéléré (ASE)

L'extraction par solvant accéléré (ASE) est une technique d'extraction solide-liquide sous pression (10 et 15 MPa) à température élevée (50 et 200°C) [53]. Aussi appelée, extraction par fluide sous pression (PFE), extraction par fluide pressurisé (ASE),

extraction améliorée par solvant (ESE) et extraction par solvant haute pression (HSPE), l'ASE est une technique plus rapide que les techniques conventionnelles (macération, Soxhlet et hydrodistillation) et la consommation de solvants est réduite comparativement à ces méthodes [27]. L'ASE n'a jamais été utilisée pour extraire les phytohormones des algues. Cependant, il est possible de retrouver, dans la littérature, des exemples d'extraction de différents composés issus des algues, et ce, par ASE. Des huiles ont été extraites d'algues vertes filamenteuses (*Rhizoclonium hieroglyphicum*) avec des solvants organiques tels que le méthanol, le chloroforme, l'isopropanol et l'hexane, en utilisant un système ASE et en mélangeant 2,5 g d'algues séchées à de la terre de diatomée et du sable d'Ottawa [54]. Tout de même, dans un article de Wang *et al*, 2016, une méthode utilisant l'ASE a permis d'extraire plusieurs phytohormones tel que l'acide abscissique, de la gibbérelline A3, de la gibbérelline A4, de l'acide indole-3-acétique, de la zéatine et du riboside zéatine chez des plantes (*Pinus massoniana L.*) [55]. Ceci ouvre la voie pour l'application chez les algues.

5.3 Purification des extraits d'algues

Il existe différentes voies de purification lors d'extraction. L'extraction en phase solide est une technique de plus en plus populaire qui tire son engouement de son faible coût, sa simplicité, l'économie de solvant et de la diminution du temps de manipulation [56]. Principalement, il existe une variété d'adsorbants pouvant être utilisés qui vont utiliser des méthodes de séparation différentes telles que l'échange d'ions, la phase inverse C18 et le mode mixte [56].

Récemment, les phytohormones ont été purifiées et concentrées à l'aide de résines échangeuses d'ions commerciales (anionique et cationique). Cette méthode a permis de quantifier des phytohormones du riz [49]. Dans l'article de Cao *et al*, 2016, l'extraction en phase solide (SPE) binaire a été utilisée [49]. L'extraction en phase solide binaire utilise une résine échangeuse d'anions et de cations pour purifier les phytohormones à partir d'extraits bruts.

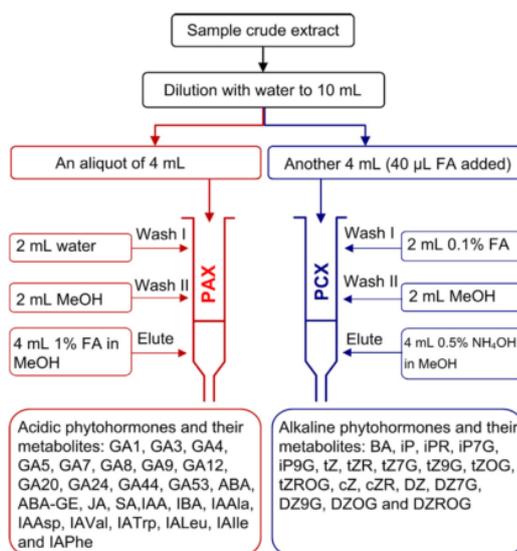


Figure 18 : Schéma de l'extraction et de la purification de phytohormones et de leurs métabolites [49]

L'utilisation de cartouche SPE est une alternative à l'extraction liquide-liquide traditionnelle pour la purification des extraits. Pour éviter les interférences causées par les lipides et d'autres substances matricielles dans les extraits, Cui *et al*, 2015 propose d'utiliser des cartouches Oasis MCX SPE couplée à l'extraction liquide-liquide (LLE) avant l'analyse par LC-ESI-MS/MS [57]. La cartouche MCX est un support utilisé en mode mixte en phase inverse échangeuse de cations pour l'analyse des composés anioniques. Elle a donc une sélectivité élevée pour les composés anioniques.

Agilent propose des colonnes SPE telles que Bond Elut Plexa PAX (échangeuse d'anions en mode mixte) et Bond Elut Plexa PCX (échangeuse de cations en mode mixte). Le Plexa est un polymère avec une surface non rétentive, hydroxylée, sans amide et avec un noyau PS/DVB (polystyrène/divinylbenzène) non polaire qui lui donne la capacité de retenir les petites molécules [58, 59]. De cette façon, les phytohormones acides purifiées avec la PAX sont séparées des phytohormones basiques purifiées avec la PCX. Les cartouches échangeuses d'ions sont utilisées pour diminuer l'interférence causée par les pigments et les lipides. Les échantillons et les cartouches doivent être prétraités avant la purification (voir tableau 6).

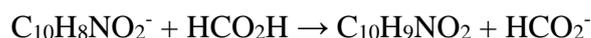
Tableau 4 : Méthodes de purification recommandées par la compagnie Agilent pour le traitement des cartouches Plexa PAX et PCX [60]

	Acide	Neutre		Bases
Échantillon prétraité	LogP > 1.0 pKa < 5 Plexa PAX	LogP > 1.5 pKa < 3-5 Plexa (Acid load method)	LogP > 1.5 pKa 6-10 Plexa (Bases load method)	LogP > 0.8 pKa < 6-10 Plexa PCX
Prétraitement de l'échantillon	2% NH ₄ OH	1% HCO ₂ H	2% NH ₄ OH	2% H ₃ PO ₄
Condition sorbant	100% MeOH			
Équilibre	100% H ₂ O			
Load	Appliquer un échantillon prétraité			
Lavage	100% H ₂ O	5% MeOH dans H ₂ O		2% HCO ₂ H dans H ₂ O
Élution 1 et lavage 2	100% MeOH <i>Neutres</i>	100% MeOH <i>Neutres</i>		1 : 1 MeOH/ACN <i>Acides/Neutres</i>
Élution 2	5% HCO ₂ H dans le méthanol <i>Acides</i>			5% NH ₃ dans 1 : 1 MeOH/ACN <i>Bases</i>
Analyses	Préparation de l'extrait pour l'analyse expérimentale			

Dans le cas des cartouches SPE PAX, l'ajout d'hydroxyde d'ammonium aux échantillons permet de donner une forme chargée négativement aux composés. Par exemple, les auxines (ex. l'acide indole-3-acétique) vont avoir une charge négative due à leur fonction carboxylate (COO⁻). Une fois chargée, les composés vont interagir avec le sorbant chargé positivement.



Finalement, une fois élués avec l'acide formique, les composés vont se retrouver sous leur forme protonée.



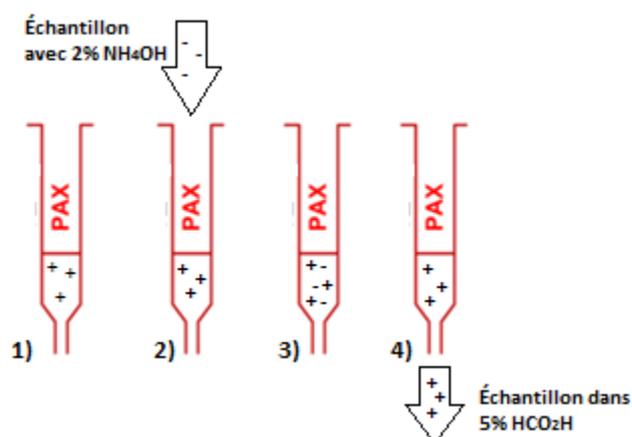
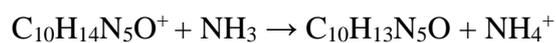
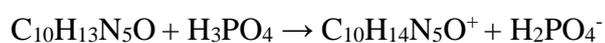


Figure 19. Schéma de la purification des phytohormones sur une cartouche SPE PAX (1) conditionnement de la cartouche (2) ajout de l'échantillon prétraité avec de l'ammonium (3) lavage (4) récupération de l'échantillon avec l'acide formique

La purification avec une cartouche PCX va permettre de simplifier la matrice. Le traitement avec l'acide phosphorique confère aux cytokinines (ex. *trans*-Zéatine) une charge positive. De cette façon, ils seront retenus sur la cartouche jusqu'à leur élution avec de l'ammoniaque.



6. MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES PHYTOHORMONES ISSUES DE LA LITTÉRATURE

6.1 Quantification des composés actifs par des tests enzymatiques ELISA

Pour la première fois en 1928, le test bio essai a été utilisé pour identifier les auxines [56]. Les recherches sur les tests enzymatiques ont évolué pour devenir plus sensibles et précises [61]. Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), aussi connu sous le nom de dosage immuno-enzymatique (EIA), est une technique de dosage sur plaque utilisée pour quantifier les peptides, protéines, anticorps et les hormones [56, 62]. Globalement, un antigène est immobilisé sur une surface solide (plaque à 96 puits) puis complexé avec un anticorps lié à une enzyme [62]. L'activité enzymatique est mesurée par l'incubation avec un substrat.

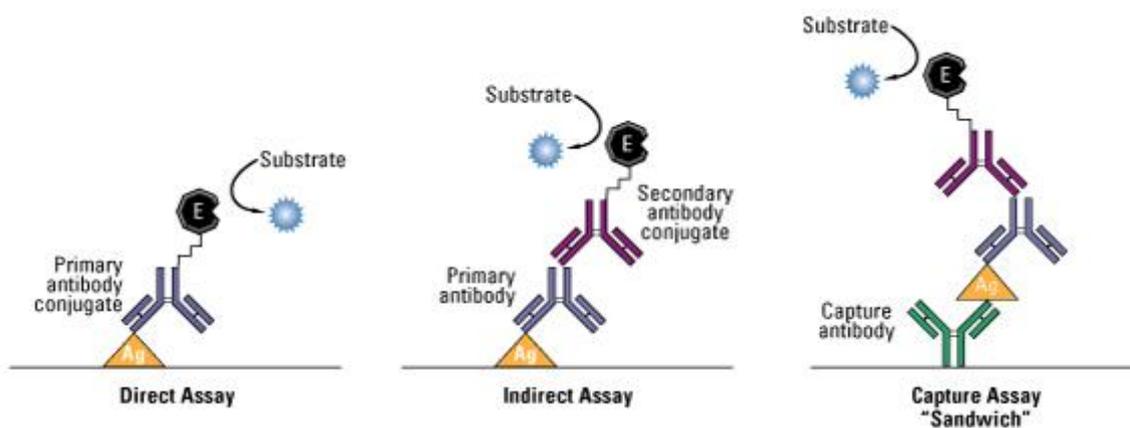


Figure 20 : Formats courants de l'immobilisation de l'antigène pour un test ELISA [62]

Plusieurs articles rapportent l'utilisation de ELISA pour le dosage spécifique des auxines. [56, 61, 63], mais aussi des cytokinines [1]. Par exemple, le dosage ELISA a été utilisé pour suivre les changements de concentration de IAA et d'isopentényl adénosines dans des semis de Litchi [63]. Pour ce qui est des algues, la complexité de la matrice rend difficile l'analyse par test ELISA. Les tests ELISA commerciaux ont tous été mis au point pour doser des phytohormones de plantes terrestres. Dans le cadre de ces recherches, Merinov a fait des essais avec plusieurs kits différents pour essayer de valider une méthode ELISA pour les IAA d'algues, mais la matrice algale complexifie l'analyse. Probablement que des composés dans les échantillons interféraient avec les méthodes

ELISA. L'hypothèse émise par Merinov est que les échantillons étaient trop visqueux, dû à la présence d'alginate, pour bien se distribuer dans les puits des kits. De sorte que des travaux plus poussés sur les méthodes d'extraction et de purification seraient nécessaires pour pouvoir utiliser des kits ELISA sur les algues.

6.2 Quantification des auxines par colorimétrie

L'article de Guo *et al*, 2010 propose une méthode de quantification de l'acide indole-3-acétique (IAA) et l'acide indole-3-butyrique (IBA) avec le *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (PDAB) [47]. Les indoles et le PDAB absorbent dans la région ultraviolette et n'ont pas d'absorbance caractéristique dans la région du visible (400-750 nm) [64]. La réaction d'Ehrlich permet de créer un nouveau chromophore possédant une bande d'absorbance à 583 nm. Ainsi, à l'aide du chromophore, il est possible de quantifier l'IAA et l'IBA. Les auxines (IAA et IBA) contenues dans les germes de soya ont été quantifiées par colorimétrie en utilisant le PDAB [64]. Les quantités retrouvées varient entre 2,38 – 3,32 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour IAA et entre 1,82 – 2,16 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour IBA en matière fraîche. Dans le cadre de ce mémoire, un intérêt particulier sera accordé à la spectrométrie UV-visible.

6.2.1 Spectroscopie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet (UV) et le visible

Les espèces organiques, chimiques et biochimiques, absorbent à certaines longueurs d'onde en ultraviolet et visibles. Dans le cas des molécules organiques, l'absorption de la lumière est due aux interactions des photons avec les électrons qui sont impliqués dans la formation de liaisons ou localisés sur les atomes d'oxygène, d'azote, de soufre ou d'halogène [65]. La longueur d'onde d'absorption va dépendre de l'énergie de liaison des électrons d'une molécule [65]. C'est pour cette raison que les liaisons simples sont peu étudiées en spectroscopie; elles ont une énergie de liaison très forte impliquant une énergie d'absorption inférieure à 180 nm [65]. Les liaisons doubles et triples peuvent être facilement excitées par des ondes électromagnétiques. Le tableau suivant donne une approximation des longueurs d'onde maximale et des intensités caractéristiques de certains groupements organiques insaturés. Ces caractéristiques vont

dépendre de la nature du solvant et des particularités spécifiques aux composés comme la présence de conjugaison entre deux chromophores [65].

Tableau 5 : Caractéristiques de l'absorption de quelques chromophores organiques courants [65].

Chromophore*	Exemple	Solvant	λ_{\max}/nm	ϵ_{\max}
Alcène	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -heptane	177	13 000
Alcène conjugué	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -heptane	217	21 000
Alcyne	$\text{C}_5\text{H}_{11}\equiv\text{CCH}_3$	<i>n</i> -heptane	178	10 000
Carbonyle	$\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$	<i>n</i> -hexane	186 280	1 000 16
Carboxyle	CH_3COOH	Éthanol	204	41
Amido	$\text{CH}_3(\text{CO})\text{NH}_2$	Eau	214	60
Azo	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	Éthanol	339	5
Nitro	CH_3NO_2	Iso-octane	280	22
Nitroso	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	Éther éthylrique	300 665	22 100
Nitrate	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	Dioxane	270	12
Aromatique	Benzène	<i>n</i> -hexane	204 256	7900 200

*Groupement fonctionnel organique insaturé

Les composés organiques saturés sont caractérisés par la présence de doublets électroniques non liants qui peuvent être excités entre 170 nm et 250 nm. Les solvants comme le méthanol ou l'éthanol vont absorbés dans ce domaine, empêchant, souvent la

quantification des analytes ayant une absorbance dans ce domaine de longueur d'onde [65].

Principalement, on retrouve les espèces absorbantes et les espèces non absorbantes. Ces dernières nécessitent la réaction avec un réactif chromophore pour former un produit qui va absorber dans l'UV ou le visible [65]. Les espèces absorbantes vont absorber naturellement et n'ont pas besoin de réagir avec un réactif. Dans le cadre de ce projet, comme l'extrait contient plusieurs molécules, la réaction avec un réactif permettra de mettre en évidence le groupement qui aura une aptitude à réagir avec celui-ci.

6.2.2 Appareils utilisés en spectroscopie

Le spectrophotomètre est l'appareil utilisé pour mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde définie. Le monochromateur est un réseau de diffraction: son rôle est de répartir le faisceau lumineux de gammes de longueurs d'onde larges en une longueur d'onde composante, c'est-à-dire, une gamme de longueurs d'onde étroites. Certains appareils vont avoir plusieurs chromateurs. La lumière monochromatique traverse une cuvette contenant la solution à analyser. L'appareil va alors mesurer l'intensité de la lumière avant et après avoir traversé la cuvette.

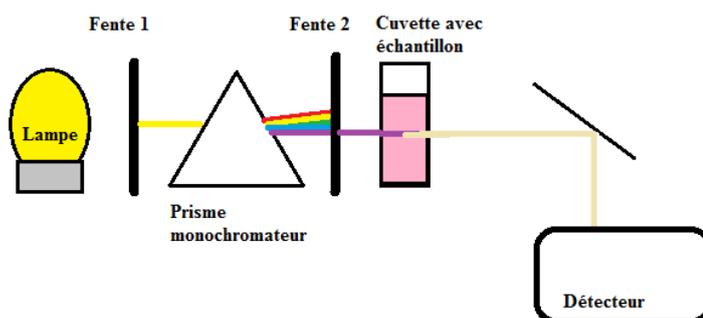


Figure 21 : Schéma simplifié d'un spectrophotomètre UV-visible

Habituellement, pour mesurer dans le visible, les lampes de tungstène sont utilisées et les lampes de deutérium sont utilisées dans l'UV. Les appareils sont équipés de deux lampes pour couvrir l'UV-visible. Les fentes (figure 19) sont utilisées pour filtrer la lumière. Les appareils équipés de 2 faisceaux peuvent mesurer l'intensité de la lumière

d'un échantillon et d'une référence; un « blanc ». Les détecteurs souvent utilisés sont les photodiodes ou les tubes photomultiplicateurs. Les photons vont entrer dans le détecteur et exciter des électrons. Les électrons vont émettre un signal sous forme de courant électrique en passant par une résistance et une lecture de voltage est effectuée. Cette mesure va être utilisée pour déterminer l'absorbance de la lumière.

6.2.3 Équations utilisées en spectroscopie d'absorption

Le terme spectroscopie d'absorption est utilisé lorsqu'on mesure la transmittance (T). La transmittance est définie selon un rapport qui caractérise la transmission d'une grandeur dans un système, soit la grandeur d'un flux lumineux mesurée à l'entrée et à la sortie d'un système (équation 1). I_T est l'intensité transmise et I_0 est l'intensité incidente.

Équation 1 : Transmittance

$$\%T = \frac{I_T}{I_0} \cdot 100$$

En utilisant des règles mathématiques, il est possible de relier la transmittance à l'absorbance (équation 2). L'absorbance (A) est la capacité d'un composé à absorber la lumière.

Équation 2 : Absorbance

$$-\log T = -\log \frac{I_T}{I_0} = A$$

La loi de Beer–Lambert–Bouguer est une relation empirique reliant l'atténuation d'un faisceau de lumière qui traverse un milieu. Cette loi permet d'établir une proportion entre la concentration et l'absorbance obtenue (équation 3) où A représente l'absorbance, l est la longueur du chemin optique traversé par la lumière dans une solution (cm), c est la concentration souvent exprimée en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et ϵ représente le coefficient d'extinction molaire ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Équation 3 : loi de Beer–Lambert–Bouguer

$$A = \epsilon lc$$

Lorsqu'une solution contient plusieurs composés chromophores, l'équation de l'absorbance prend une autre forme (équation 4) pour un parcours optique de 1 cm. Donc, si plusieurs composés différents ont une même capacité d'absorbance à une longueur d'onde définie, leur absorbance est cumulative.

Équation 4 : Absorbance avec plusieurs chromophores

$$A = \sum_{i=1}^n A_i(\varepsilon_{\lambda,i,l=1cm,c_i}) = \varepsilon_{\lambda,1}c_1 + \varepsilon_{\lambda,2}c_2 + \dots \varepsilon_{\lambda,n}c_n$$

6.3 Quantification des phytohormones par des méthodes chromatographiques

La quantité de phytohormones et de leurs dérivés dans les tissus des plantes est relativement faible (généralement à des niveaux du $\mu\text{g L}^{-1}$ à mg L^{-1}). De plus, elles possèdent des structures similaires spécialement les métabolites gluconiques des CTK, d'où l'intérêt d'utiliser la spectrométrie de masse pour l'analyse et la caractérisation des composés. Les principales méthodes chromatographiques utilisées pour caractériser et quantifier les molécules algales de faibles masses moléculaires sont la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) et la chromatographie liquide (LC-MS) couplées à la spectrométrie de masse [37]. La spectrométrie de masse possède l'avantage de faciliter la caractérisation et la séparation des composés notamment par l'extraction d'ions des chromatogrammes.

Le GC-MS est une technique sensible et simple qui se limite aux molécules volatiles. Les extraits non volatils doivent donc être dérivés avant leur analyse [6]. Dans la littérature, le GC-MS a été utilisé avec succès pour quantifier plusieurs classes de phytohormones [66–69]. Le tableau suivant résume les différentes colonnes utilisées pour analyser certains composés de la classe des auxines, gibbérellines, acides jasmoniques, cytokinines et leurs dérivés.

Tableau 6 : Types de colonnes utilisées pour la quantification des phytohormones par GC-MS

Type de colonne / L, ID, EF*	Phase stationnaire	Type de matrice	Phytohormone **	Réf
Rtx-5Sil MS / 30 m, 0,25 mm 0,25 um	Silice fondue de type arylène 5% phényl - 95% méthylpolysiloxane	Racine de tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>) et semis d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	ACC, IAA, SA, JA, ABA	[68]
DB-5MS (UI) / 30 m, 0,25 mm, 0,25 um	(5%-phényl) - méthylpolysiloxane et silice fondue	Feuille d' <i>Ulmus pumila</i>	SA, JA, salicylate de méthyle et jasmonate de méthyle	[35]
Colonne capillaire en silice fondue ZB-50 / 30 m, 0,25 mm, 0,25 um	50% -phényl-50% - diméthylpolysiloxane	<i>Arabidopsis thaliana</i>	IAA, ABA, JA	[69]
SGE Pty Ltd., Mel bourne; BP1 / 15 m, 0,22 mm 0,25 µm	Phase liée à 100% de diméthylpolysiloxane	<i>Rhizobium</i>	IAA	[67]
SGE, BPX70 / 15 m, 0,25 mm, 0,25 µm	Phase groupée à 70% de cyanopropyl polysilphénylène-siloxane	<i>Rhizobium</i>	IAA	[67]
DB 1-15N /15 m, 0,25 mm, 0,25 um	100% diméthylpolysiloxane	<i>Ochetophila trinervis</i>	IAA, GA	[70]

*Légende : L : Longueur (mm), ID : diamètre interne (mm), PT : Épaisseur du film (µm)
 **Acronymes : ACC: acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique, IAA: acide indole-3-acétique, JA: acide 6-jasmonique, SA: acide salicylique, ABA: acide 6-abscissique, GA: acide gibbérellique

Cependant, l'analyse en LC MS/MS conduit à une plus grande sensibilité et à des limites de détection inférieures comparativement aux analyses en GC-MS. La LC MS/MS a été utilisée dans la littérature pour quantifier les phytohormones dans le riz avec une colonne C18 [49]. Le tableau suivant résume les différents types de colonnes utilisées en LC pour quantifier les phytohormones.

Tableau 7 : Types de colonnes utilisées pour la quantification des phytohormones au LC-MS

Type de colonne / L, ID, PT*	Phase stationnaire	Type de matrice	Phytohormone**	Réf
ZORBAX Extended-C18 / 100 mm, 2,1mm, 1,8 µm	C18	Riz (<i>Oryza sativa</i>)	IAA, ABA, JA, SA, GA, BA, iP, tZ, tZR, etc.	[49]
Luna C18 (Phenomenex) / 150 mm, 4,6 mm, 5µm	C18 avec embout TMS sur silice entièrement poreuse	Algue de la baltique, <i>Cladophora glomerata</i> et <i>Spirulina sp</i>	IAA, IBA, PAA, NAA, IP, tZ, KA, 6-BA, ABA	[50]
Thermo Hypersil ODS-2 / 150 mm, 2,1 mm, 5µm	Octadécyl silane (C18)	Colza (<i>Brassica napus L.</i>)	IAA, GA, ABA, tZ, BA, iP, SA, JA	[57]
Hypersil GOLD / 150 mm, 2,1mm, 3 µm	C18	Sérum humain	Stérols	[71]

*Légende: L: Longueur (mm), ID : diamètre interne (mm), PT : taille des particules (µm)

**Acronyme : IAA : acide indole-3-acétique, ABA : acide abscissique IBA : acide indole-3-butyrique, JA : acide jasmonique, PAA : acide phénylacétique, SA : acide salicylique, BA : benzyladenine, 6-BA : benzylaminopurine, GA : acide gibbérellique A3, NAA : acide 1-naphtalénacétique iP : isopentenyladenine, K : kinétine, tZ : *trans*-zéatin, tZR : *trans*-zéatin riboside

6.3.1 Principe des appareils utilisés en chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse

6.3.1.1 Général

Un spectromètre de masse est constitué d'une source d'ions, un analyseur de masse et d'un détecteur qui sont tous opérés dans des conditions de vide élevé. Le but de la spectrométrie de masse est de générer des ions à partir de composés inorganiques ou organiques de les séparer par leur ratio masse/charge (m/z) [72].

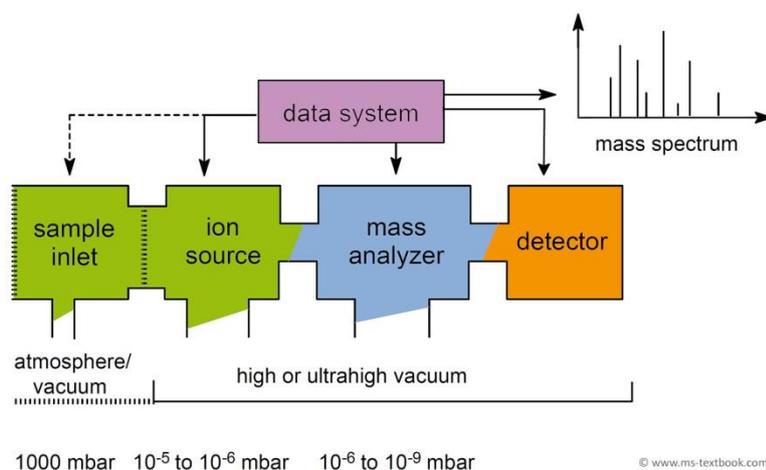
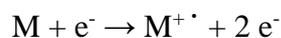


Figure 22 : Schéma général d'un spectromètre de masse [72]

6.3.1.2 Ionisation

Classiquement, l'ionisation implique un bombardement d'électrons énergétiques dans un gaz neutre [72]. Pour pouvoir ioniser un atome neutre, l'énergie provenant de la collision d'électrons doit être égale ou supérieure à l'énergie d'ionisation [72].



L'énergie d'ionisation (EI) nécessaire pour la transition verticale des molécules est représentée sur la figure suivante. Le processus d'ionisation repose sur la théorie de quasi-équilibre [72].

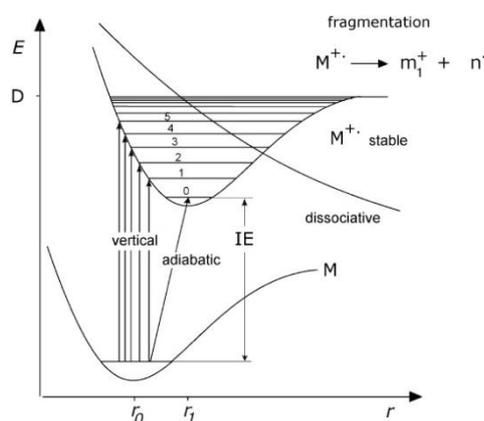


Figure 23 : La transition verticale des molécules excitées par l'énergie cinétique des électrons [73]

Il existe différentes méthodes d'ionisation à pression atmosphérique (API) telles que l'ionisation par dispersion thermique (thermospray), l'ionisation électrohydrodynamique (EHI) et l'ionisation par électronébulisation (électrospray) (ESI). L'ESI est similaire à l'EHI, un brouillard de gouttelettes chargées électriquement de la taille du micromètre est généré, mais contrairement à l'EHI, l'ESI est durable à pression atmosphérique. On peut résumer la formation d'ions par ESI en quatre étapes; la pulvérisation d'un aérosol de gouttelettes micrométriques chargées électromagnétiquement, la réduction de la taille des gouttelettes par évaporation rapide du solvant, la désintégration répétée des microgouttelettes en unité plus petites et la libération d'ions complètement désolvatés dans la phase gazeuse [72].

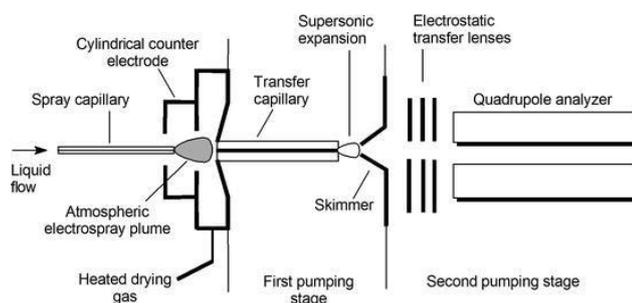


Figure 24 : Schéma d'une interface d'ESI [72]

6.3.1.3 La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR)

Le principe général sur la spectrométrie de masse repose sur le mouvement d'ions. En FT-ICR, les ions sont en mouvement dans un plan orthogonal dans la direction d'un champ magnétique et sont forcés à être en orbite par l'action de la force de Lorentz [72]. Par définition, la force de Lorentz aussi appelé force électromagnétique est la force subie par une particule chargée dans un champ électromagnétique [72]. Le rayon de l'orbite de l'ion va dépendre de l'énergie cinétique de l'ion, qui dépend de la fréquence d'oscillation laquelle dépend de la masse de l'ion. Pour induire ce mouvement, les ions sont transférés dans un champ magnétique et ont besoin d'un champ électrique pour être excités. Une fois excités, les ions de m/z égaux circulent de façon cohérente à l'intérieur de la cellule ICR [72]. Sur leur passage, l'ensemble des ions gazeux vont être détectés sur la paroi interne de la cellule ICR. Le signal engendré, traduit en courant d'images, est reporté en domaine de temps qui est ensuite transformé par transformée de Fourier (FT) et finalement utilisé pour calculer la valeur de m/z correspondante [72].

6.3.1.4 L'Orbitrap

L'Orbitrap est un piège à ions dans lequel les composés ionisés sont en orbite à une fréquence précise en fonction de leur ratio m/z autour d'une électrode. Ce principe permet de séparer précisément les composés d'un mélange pour procéder à leur identification.

Contrairement à la LC MS/MS, la LC-MS Orbitrap possède l'avantage majeur de pouvoir déterminer la masse exacte des produits séparés fournissant ainsi la formule brute des composés, ce qui permet l'analyse de composés inconnus pouvant avoir des activités biologiques. L'Orbitrap agit comme analyseur et comme détecteur. Il est constitué de deux électrodes externes et d'une électrode centrale [74]. Plus précisément, l'Orbitrap est une trappe à ion. Le mouvement des ions va être initié par une radiofréquence. Ensuite, les ions en mouvement sont capturés dans un champ électrostatique. L'attraction électrostatique de l'électrode centrale est ensuite compensée par la force centrifuge qui est due à la vitesse tangentielle de l'ion. L'oscillation engendrée dans l'Orbitrap va être différente selon les ions, ce qui permet de séparer les ions [72]. En effet, la fréquence va dépendre de la charge ionique, de la masse et de la courbure du champ électrostatique.

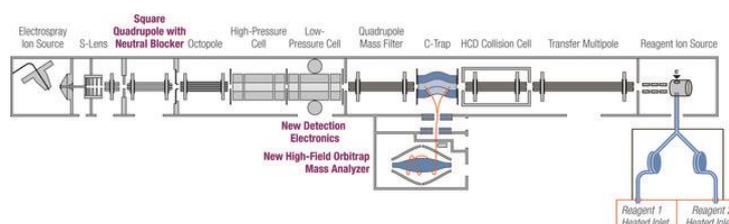


Figure 25 : Schéma de l'Orbitrap [75]

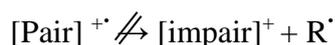
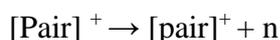
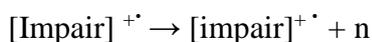
6.3.1.5 Quantification

Il existe différents moyens de quantifier en spectrométrie de masse; la calibration interne et la calibration externe. Lorsque la calibration interne est utilisée, des standards sous forme d'isotopes sont ajoutés à des échantillons. Lors de la calibration externe, une droite de calibration est effectuée avec des standards et l'intensité de ceux-ci est mesurée pour en faire une droite de calibration.

6.3.1.6 Fragmentation

Comme vu précédemment, l'ESI crée principalement des ions chargés positivement par éjection d'un électron d'une molécule neutre. Les paires d'électrons libres et les orbitales π sont les sites les plus propices à céder leurs électrons, car ils ont une faible énergie d'ionisation [72]. Dans les petites molécules, suite à l'ionisation, il se produit souvent le clivage de liaisons simples. D'autres types de clivage sont aussi remarqués comme le clivage en alpha d'un radical, clivage d'un lien allylique, l'isomérisation, le clivage de lien sur une chaîne alcane, le réarrangement de McLafferty, etc.

Certaines règles sont importantes à respecter lors de la fragmentation. La règle des électrons pairs stipule que les ions avec les électrons impairs peuvent éliminer soit un radical ou un fragment neutre d'électrons pairs, mais les ions avec des électrons pairs ne perdent habituellement pas de radical pour former un cation d'électron impair [72]. De façon illustrée :



La règle de Stevenson dicte que lorsqu'une fragmentation se produit, la charge positive reste sur le fragment avec la plus faible énergie de liaison [72]. Cette règle a d'abord été appliquée pour les alcanes, mais elle est généralement valide pour les autres molécules.

Une autre des règles importantes est celle de l'azote. Lorsqu'on utilise les éléments les plus communs en chimie organique (H, B, C, N, O, S, Si, P, F, Cl, Br), seulement l'azote (N) a un nombre impair d'électrons de valence et une masse atomique paire. En résumé, toute molécule organique possédant une masse moléculaire impaire contient un nombre impair d'atomes d'azote.

De façon générale, la stabilité de l'ion moléculaire diminue dans l'ordre suivant : composés aromatiques > alcènes conjugués > alcènes > composés alicycliques (composés aliphatique et cyclique) > composés carbonyles > alcanes linéaires > éthers > ester > amines > acides carboxyliques > alcools > alcanes branchés [72]. Plus l'ion est instable, plus il va subir de fragmentations [72].

L'étude de la fragmentation des composés est un excellent moyen d'identification de ceux-ci. Les fragments générés vont être caractéristiques et permettent de remonter à la molécule initiale.

7. TRAVAUX RÉALISÉS SUR LES PHYTOHORMONES DANS LES ALGUES

Dans la littérature, pour les *Phaeophyceae*, on retrouve plusieurs classes de phytohormones telles que les IAA (*Macrocystis*, *Laminaria*, *Fucus*, *Ascophyllum*), cytokinines (*Fucus*, *Ascophyllum*, *Sargassum*, *Macrocystis*), gibbérellines (*Fucus*), ABA (*Ascophyllum*, *Laminaria*) et polyamines (*Dyctiota*) [5]. De façon générale, les phytohormones sont retrouvées en faible quantité de l'ordre du $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (tableau 10). De plus, les méthodes d'analyse générale préconisées sont le GC-MS, HPLC et le LC-MS.

La littérature présente des travaux sur les phytohormones pour les *Rhodophyceae* comme la *Pyropia haitanensis* [46] et dans d'autres espèces comme le suggère l'article de Stirk *et al*, 2003 [39]. On retrouve aussi des phytohormones dans les *Chlorophyceae*, comme celles de la mer baltique [50], dans les *Cladophora glomerata* [50], dans plusieurs espèces de *Ulva* [76] et de *Monostroma* [76], mais aussi dans d'autres espèces [39]. Finalement, on souligne aussi leur présence dans les *Pheophyceae* tels que la *Laminaria japonica* [46], *M. pyrifera* [77], *Bifurcaria brassicaeformis*, *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida*, *Macrocystis angustifolia*, *Splachnidium rugosum*, *Dictyota sp.*, et *Sargassum heterophyllum* [39] et dans plusieurs espèces de *Fucus* [5]. La quantité de phytohormones va varier selon l'espèce, leur stade de croissance et l'environnement.

Tableau 8 : Littérature sur les phytohormones retrouvées dans les algues

Type de matrice	Méthode	Classe	Phytohormone* : quantité	Réf ¹
Algues de la baltique	HPLC-PDA	IAA	PAA $362,47 \pm 13,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	[50]
		CTK	<i>tZ</i> $154,45 \pm 20,63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
<i>Cladophora glomerata</i>	HPLC-PDA	IAA	IAA $23,91 \pm 0,80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	[50]
			PAA $229,30 \pm 7,90 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
<i>Laminaria japonica</i>	LC-MS	IAA	IAA $6,26 \pm 2,46 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	[46]
		CTK	<i>tZR</i> $0,37 \pm 0,12 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	
			IPAA $6,77 \pm 0,42 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	
			IPAb $7,19 \pm 1,25 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	
		GA	A3 $2,24 \pm 0,42 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	
		ABA	$2,78 \pm 0,28 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	
		JA	$3,27 \pm 0,59 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	
<i>Pyropia haitanensis</i>	LC-MS	IAA	IAA $9,95 \pm 3,17 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	[46]
			PAA $4,17 \pm 1,29 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	

Type de matrice	Méthode	Classe	Phytohormone* : quantité	Réf ¹
		CTK	<i>t</i> ZR 0,16 ± 0,05 ng·g ⁻¹ IPAA 6,54 ± 0,32 ng·g ⁻¹ IPAb 2,73 ± 0,35 ng·g ⁻¹	
		ABA	5,22 ± 0,48 ng·g ⁻¹	
		SA	17,35 ± 1,39 ng·g ⁻¹	
Concentré dérivé de <i>M. pyrifera</i> .	HPLC	IAA	29,6 – 120,79 pmol·mL ⁻¹	[77]
		CTK	3,12 – 8,68 pmol·mL ⁻¹	
Concentré dérivé de <i>E. maxima</i>	HPLC	IAA	20,55 – 33,91 pmol·mL ⁻¹	[77]
		CTK	4,88 – 7,62 pmol·mL ⁻¹	
Phaeophyta du Cape <i>Bifurcaria brassicaeformis</i> , <i>Ecklonia maxima</i> , <i>Laminaria pallida</i> , <i>Macrocystis angustifolia</i> , <i>Splachnidium rugosum</i>	HPLC-MS	CTK	iP 4.7 – 35.5 pmol·g ⁻¹ iPR 2.2 – 15.1 pmol·g ⁻¹ iPR5MP 3.1- 43.1 pmol·g ⁻¹ <i>t</i> Z 1.0 – 11.9 pmol·g ⁻¹ <i>c</i> Z 0.06 – 3.0 pmol·g ⁻¹ <i>t</i> ZR 0.01 – 0.1 pmol·g ⁻¹ <i>c</i> ZR 0.2 – 0.8 pmol·g ⁻¹ <i>t</i> ZOG 0.4 – 14.0 pmol·g ⁻¹ <i>c</i> ZOG 0.3 - 0.4 pmol·g ⁻¹ <i>c</i> ZR-OG 0.1 - 0.4 pmol·g ⁻¹ <i>t</i> ZR-5MP 0.1 - 6.9 pmol·g ⁻¹ <i>c</i> ZR-5MP 1.1 – 10.4 pmol·g ⁻¹ DHZ 0.06 pmol·g ⁻¹ BA 0.5 – 0.9 pmol·g ⁻¹ <i>m</i> T 1.7 – 3.0 pmol·g ⁻¹ <i>o</i> T 2.8 – 18.8 pmol·g ⁻¹ <i>o</i> TR 0.04 – 3.5 pmol·g ⁻¹ <i>m</i> TOG 2.4 – 4.7 pmol·g ⁻¹ <i>o</i> TOG 0.2 – 1.1 pmol·g ⁻¹	[39]
Phaeophyta de KwaZulu-Natal <i>Dictyota sp.</i> , <i>Sargassum heterophyllum</i>	HPLC-MS	CTZ	iP 35.5 – 48.2 pmol·g ⁻¹ iPR 5.5 – 7.4 pmol·g ⁻¹ iPR5MP n.d. <i>t</i> Z 0.5 – 2.4 pmol·g ⁻¹ <i>c</i> Z 2.0 – 11.0 pmol·g ⁻¹ <i>t</i> ZR < LOD <i>c</i> ZR 0.5 – 0.6 pmol·g ⁻¹ <i>t</i> ZOG 15.8 – 18.7 pmol·g ⁻¹ <i>c</i> ZOG 1.0 – 1.1 pmol·g ⁻¹ <i>c</i> ZR-OG 1.1 pmol·g ⁻¹ <i>t</i> ZR-5MP n.d. <i>c</i> ZR-5MP n.d. DHZ < LOD BA 0.6 – 2.0 pmol·g ⁻¹ <i>m</i> T 1.4 -1.7 pmol·g ⁻¹	[39]

Type de matrice	Méthode	Classe	Phytohormone* : quantité	Réf ¹
			<i>o</i> T 2.9 – 6.9 pmol·g ⁻¹ <i>o</i> TR < LOD <i>m</i> TOG 2.9 – 4.3 pmol·g ⁻¹ <i>o</i> TOG 0.1 – 0.2 pmol·g ⁻¹	
Différentes espèces de <i>Ulva</i> et <i>Monostroma</i>	HPLC	IAA	IAA 3.24 – 11.16 nmole·g ⁻¹ FW IBA 19.29 – 35.24 nmole·g ⁻¹ FW	[76]
		CTZ	KR 0.76 – 3.35 nmole·g ⁻¹ FW	
		GA	A3 2.26 – 8.46 nmole·g ⁻¹ FW	
		ABA	11.35 – 68.28 nmole·g ⁻¹ FW	
<i>U. fasciata</i> , <i>U. lactuca</i> , <i>U. taeniata</i> , <i>U. linza</i> et <i>M. oxyspermum</i>		SA	2.20 – 14.85 nmole·g ⁻¹ FW	
<i>Fucus distichus</i> et <i>F. vesiculosus</i>	n.d.	IAA	2–9 ng·g ⁻¹ FW	[5]

1. Réf : Référence

*Définition des abréviations ; IAA : acide indole-3-acétique, ABA : acide abscissiques IBA : acide indole-3-butyrique, JA : acide jasmonique, PAA : acide phénylacétique, SA : acide salicylique, BA : benzyladénine, DHZ : dihydrozéatin, A3 - gibbérelline A3, iP : isopentenyladénine, IPAA : N6-(2-isopentenyl)adénosine, IPAb : N6-(2-isopentyl)adénosine, iPR5MP : isopentenyladénosine-5-monophosphate, iPR : isopentenyladénosine riboside, KR : kinétine riboside, *m*-T : *meta*-topolin, *o*-T : *ortho*-topolin, *o*-TR : *ortho*-topolin riboside, *m*-TOG : *meta*-topolin-O-glucoside, *o*-TOG : *ortho*-topolin-O-glucoside, *c*-Z : *cis*-zéatin, *t*-Z : *trans*-zéatin, *c*-ZOG : *cis*-zéatin-O-glucoside, *t*-ZOG : *trans*-zéatin-O-glucoside, *c*-ZR : *cis*-zéatin riboside, *t*-ZR : *trans*-zéatin riboside, *c*-ZR-OG : *cis*-zéatin riboside-O-glucoside, *c*-ZR-5MP : *cis*-zéatin riboside-5'-monophosphate, *t*-ZR-5MP : *trans*-zéatin riboside-5'-monophosphate

Globalement, selon la littérature, les travaux réalisés sur les phytohormones contenus dans les algues montrent qu'elles contiennent des phytohormones en faible quantité. La chromatographie est habituellement utilisée comme méthode analytique. Les méthodes chromatographiques comme le GC-MS, le LC-MS et le HPLC sont des méthodes coûteuses, mais qui permettent l'étude précise et l'identification de nouveaux composés dans un contexte de valorisation. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous cherchons à développer une méthode précise à faible coût pour des analyses de routine dans un contexte d'utilisation industrielle. La colorimétrie s'avère une méthode simple d'utilisation et peu dispendieuse qui pourrait être adaptée par les producteurs d'engrais

d'algues enrichis en phytohormones. Au meilleur de nos connaissances, il y a des lacunes dans la littérature sur l'utilisation du réactif d'Ehrlich avec des matrices complexes comme les algues, d'où l'intérêt de ce projet de recherche.

Au Québec, nous disposons de ressources abondantes d'algues qui sont peu exploitées. Un intérêt particulier sera porté aux *Phaeophyceae*, dû à sa grande disponibilité et à la facilité de récolte. Aujourd'hui, il y a de plus en plus d'engouement pour l'agriculture biologique. L'utilisation d'algues à différents niveaux peut améliorer le rendement des récoltes et la qualité des productions. Il est donc important de créer des outils d'analyse pour le développement d'engrais biologiques à base d'algues afin de quantifier leur contenu.

De plus, le contenu de ces algues québécoises n'est pas documenté dans la littérature. Afin de combler ces lacunes, ce projet de maîtrise présente une méthode colorimétrique appliquée aux algues pour la quantification des auxines et montre le développement de méthodes d'identification des composés contenus dans les algues.

8. MISE EN CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

Les algues sont reconnues à travers le monde comme engrais naturel utilisé pour la fertilisation des champs. Cette biomasse, complexe en termes de constituants, renferme des biomolécules actives d'intérêts : les phytohormones. Les phytohormones créent un engouement de plus en plus important au niveau de l'agriculture. Elles sont des composés capables d'augmenter le rendement des productions végétales. Actuellement, les travaux sur les phytohormones d'algues sont peu nombreux comparativement à ce qu'on retrouve pour les végétaux terrestres. La production d'engrais liquide à base d'algues est une voie de valorisation des algues marines québécoises. En effet, des entreprises québécoises établies, comme Pro-Algues Marine et Organic Océans proposent déjà des produits fertilisants à base d'algues. De plus, une entreprise privée québécoise en partenariat avec Merinov tente de développer des produits enrichis en phytohormones à base de *Pheophyceae* comme la *S. latissima*. En revanche, le contenu en phytohormones dans la *S. latissima* n'est pas documenté dans la littérature.

Afin de suivre le processus de formulation d'engrais liquide d'algue, et ce, durant la mise à l'échelle de procédés industriels, il s'impose de créer des méthodes analytiques de quantification des phytohormones. Dans l'objectif de pouvoir transférer la méthode d'analyse en industrie (ex. contrôle qualité dans une usine de production), la quantification simple et peu coûteuse en colorimétrie s'avère une voie intéressante. De plus, le développement en parallèle de méthodes chromatographiques permettrait de suivre et valider les quantités de phytohormones. Aussi, une méthode en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permettrait d'identifier et d'analyser les fragments de chaque composé d'intérêt. Ces démarches ont pour but de favoriser la valorisation des macroalgues de l'Est du Canada par les compagnies québécoises.

8.1 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES ET HYPOTHÈSES

L'objectif général de mon projet est d'identifier et de quantifier les phytohormones dans quelques macroalgues de l'Est du Canada.

8.1.1 OBJECTIF SPÉCIFIQUE 1

Développer et optimiser une méthode d'identification et de quantification en colorimétrie des auxines dans des extraits concentrés d'algues.

Hypothèses :

- L'extraction par macération permet de récupérer les auxines sans les endommager.
- L'extraction des phytohormones peut être améliorée par ASE.
- La purification sur cartouches SPE PAX permet de simplifier les extraits et d'améliorer l'efficacité de la réaction colorimétrique.
- Les indoles et le PDAB vont réagir ensemble pour former un complexe qui absorbera dans la région du visible.
- Il sera possible de différencier l'IAA de l'IBA en colorimétrie. L'IAA et l'IBA ne réagiront pas à la même température étant donné que leur structure moléculaire est différente.
- Une faible concentration en auxine sera retrouvée dans les extraits d'algues.

Méthodologie :

- Les paramètres d'extraction seront optimisés.
- Une courbe de percée permettra d'évaluer l'efficacité des cartouches.
- Il faudra déterminer la capacité maximale des cartouches SPE PAX utilisées pour la purification.
- Le temps optimal de réaction avec le PDAB, ainsi que les concentrations en réactif (PDAB) et en catalyseur (HCl) seront déterminées.

8.1.2 OBJECTIF SPÉCIFIQUE 2

Créer une méthode de quantification des phytohormones en chromatographie.

Hypothèses :

- L'extraction des phytohormones peut être améliorée par ASE.
- Le GC-MS ne permettra pas d'obtenir les résultats désirés à cause d'une trop faible limite de détection.
- Le LC-MS permettra d'identifier les phytohormones et leurs principaux fragments.
- La fiabilité, la reproductibilité, les limites de détection et de quantification, ainsi que les effets de matrice pour les différents composés seront étudiées.

Méthodologie :

- L'extraction avec du méthanol permettra de solubiliser la majorité des phytohormones ciblées par l'étude.
- Des conditions de séparation des produits seront développées (choix de la colonne, de l'éluant et du débit) afin de séparer chromatographiquement le plus grand nombre de produits d'intérêt possibles.
- Les paramètres d'ionisation seront étudiés.
- La caractérisation des phytohormones présentes sera réalisée à partir de leur formule brute, de leur patron de fragmentation, par analyse et comparaison avec les données de la littérature de spectres de masse et à partir de leur temps de rétention.
- Les différentes classes de phytohormones pourront être séparées et identifiées par chromatographie: IAA, BR, CTK, éthylène, GA, PA, St, ABA, JA et SA [38].
- Pour les molécules complexes, les quantités de produits seront donc estimées en équivalent d'une phytohormone de structure similaire.
- En combinaison à la séparation chromatographique, nous utiliserons l'extraction d'ions spécifiques pour quantifier les différentes phytohormones.
- Les concentrations des molécules d'intérêt serviront de point de référence pour le développement d'un procédé industriel de production d'un extrait d'algues concentré en phytohormone développée à l'échelle semi-pilote chez Merinov.

- Le livre *Mass Spectrometry*, écrit par Jürgen H. Gross et édité par Springer, 3^e édition, sera utilisé pour étudier les réactions de fragmentation et pour l'identification des composés au LC-MS Orbitrap.

8.1.3 OBJECTIF SPÉCIFIQUE 3

Suivre les quantités de phytohormones lors du développement de procédés d'extraction soit à l'échelle laboratoire et industrielle.

Hypothèses :

- Il peut se produire une perte en composés d'intérêt lorsque la biomasse est chauffée.
- Les quantités retrouvées dans les extraits liquides concentrés seront supérieures aux quantités retrouvées dans les algues.

Méthodologie :

- Le procédé de production d'extrait liquide a un impact direct sur les concentrations en auxines.
- Les méthodes développées pour la quantification des phytohormones dans les macroalgues (colorimétrie et LC-MS) pourront être utilisées pour quantifier les phytohormones dans les extraits concentrés liquides d'algues.

8.2 STRUCTURE DU MÉMOIRE

La première partie du mémoire est dédiée à l'introduction générale et la revue de la littérature. Dans cette partie, un résumé de la littérature à propos des algues a été présenté, suivi d'un aperçu des principales voies de valorisation des algues. Ensuite, le rôle et la composition des algues ont été exposés. La première partie se termine par une vue d'ensemble des méthodes d'analyse des phytohormones et des concepts théoriques qui leur sont associés. Ensuite, le premier article (chapitre 2) concerne la quantification de l'IAA et de l'IBA issus de *S. latissima* par colorimétrie. Dans cet article, l'extraction par ASE, la purification par SPE et la cinétique de la réaction d'Ehrlich ont été étudiées, et

ce, pour diverses concentrations d'auxines. Le chapitre 3 concerne les premières étapes pour le développement d'une méthode analytique de caractérisation des phytohormones dans les macroalgues au GC-MS et au LC-MS. Dans le chapitre 3, nous présentons une méthode de dérivatisation de l'acide indole-3-acétique pour sa détection au GC-MS et une méthode de séparation et de quantification de cinq phytohormones au LC-MS.

Ce mémoire se termine par une conclusion générale où les hypothèses et les résultats globaux seront discutés, ainsi que les limites du projet, les travaux futurs et les perspectives de cette recherche.

CHAPITRE 2

PREMIER ARTICLE

ÉTUDE DE LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE EHRlich POUR LA QUANTIFICATION DE L'ACIDE INDOLEBUTYRIQUE: APPLICATION AUX ALGUES DE *SACCHARINA LATISSIMA*

Le premier article, s'intitulant « *Étude de la méthode colorimétrique Ehrlich pour la quantification de l'acide indolebutyrique: application aux algues de Saccharina latissima* », fut écrit par moi-même, accompagné de mon directeur Jonathan Gagnon et des partenaires de chez Merinov, c'est-à-dire Maude Sirois et Marie-Gil Fortin. J'ai réalisé les expériences ainsi que la rédaction de cet article. Le professeur Jonathan Gagnon, deuxième auteur, a apporté l'idée originale et a fortement contribué à la rédaction et la révision de cet article. Maude Sirois a participé à la révision finale de l'article, en plus d'avoir supporté les travaux en laboratoire effectué chez Merinov. Les résultats préliminaires de cette étude furent présentés au congrès international des aliments fonctionnels BENIFIQ 2018 sous forme d'affiche ayant pour titre : « *Optimization of a colorimetric method for indole-3-acetic and indole-3-butyric acids in macroalgae* » qui a eu lieu du 2 au 4 octobre 2018 au Centre des congrès de Québec au Canada. De plus, ils ont été présentés, sous forme de présentation ayant pour titre « *Identification et quantification de phytohormones dans les macroalgues de l'est du Canada* », à la journée annuelle du Collectif de Recherche appliquée aux Bioprocédés et à la chimie de l'Environnement (CRABE) qui a eu lieu le 28 mars 2019 à Rimouski sous le thème: Technologies et procédés pour la valorisation de la biomasse et la protection de l'environnement et dans le cadre de mon cours Séminaire I le 5 décembre 2019. Il fut soumis en 2020 pour publication dans la revue Journal of Agricultural and Food Chemistry. Un document complémentaire « *supporting information* » à l'article est présenté à l'annexe 3 de ce mémoire.

2.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU PREMIER ARTICLE

Les macroalgues sont utilisées en agriculture pour leurs propriétés stimulantes, en partie à cause de leur teneur en phytohormones comme les auxines. Ces molécules ont des effets importants sur la germination des graines, la croissance, la tolérance au stress et le rendement des cultures. Une méthode de quantification colorimétrique simple et rentable impliquant la réaction d'Ehrlich a été étudiée pour la détermination de la quantité d'acide indole-3-butérique (IBA) où les conditions étaient préalablement optimisées telles que la température (rt et 70 ° C), la quantité de réactifs et le temps de réaction. La cinétique de la réaction colorimétrique de l'acide indole-3-acétique (IAA) et IBA avec le 4-(diméthylamino)-benzaldéhyde (PDAB) a également été étudiée. Les résultats montrent que l'IAA interfère avec la quantification d'IBA éventuellement par la formation de dérivé PDAB-IBA-IAA (rapport molaire 1:2). L'extraction de l'algue brune *Saccharina latissima* par macération et par extraction au solvant accélérée (ASE) a été comparée. Les extraits ont ensuite été purifiés par extraction en phase solide (SPE) conduisant à un taux de récupération d'environ 100%. Une concentration dans *S. latissima* de 0,30 mg équivalent d'IBA par gramme de FW a été déterminée.

2.2 STUDY OF THE EHRLICH COLORIMETRIC METHOD FOR THE
QUANTIFICATION OF INDOLEBUTYRIC ACID: APPLICATION TO THE
SACCHARINA LATISSIMA SEAWEED

Véronique Langlois¹, Jonathan Gagnon^{1*} and Maude Sirois²

1. Department of biology, chemistry and geography, Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada
2. Merinov, 96, montée de Sandy Beach, Gaspé, Québec, G4X 2V6, Canada

*Corresponding author

Prof. Jonathan Gagnon

Jonathan_Gagnon@uqar.ca

Phone: 1-418-723-1986 ext 1691

FAX: 1-418-724-1849

Abstract

Macroalgae are used in agriculture for their stimulating properties, partially due to their content in phytohormones like auxins. These molecules have important effects on the seed germination, growth, stress tolerance and crop yield. A simple and cost-efficient colorimetric quantification method involving the Ehrlich reaction was investigated for the determination of the amount of indole-3-butyric acid (IBA) where the conditions were prior optimized such as temperature (rt and 70°C), amount of reagents, and reaction time. The kinetics of the colorimetric reaction of indole-3-acetic acid (IAA) and IBA with 4-(dimethylamino)benzaldehyde (PDAB) was also studied. The results show that IAA interfere with the quantification of IBA possibly by the formation of PDAB-IBA-IAA derivative (1:2 molar ratio). The extraction of the brown seaweed *Saccharina latissima* by maceration and by accelerated solvent extraction (ASE) was compared. The extracts were then purified by solid-phase extraction (SPE) leading to a recovery rate around 100%. A concentration in *S. latissima* of 0.30 mg equivalent of IBA per gram of FW was determined.

Keywords: Auxins, indoleacetic acid, indolebutyric acid, Ehrlich reaction, extraction of phytohormones, brown seaweeds, colorimetry

1. Introduction

Phytohormones like auxins modulate biological pathways in plants.[78] Phytohormones not only act as a biostimulant but also improve the efficiency of the NPK fertilizer.[21] Auxins are secondary metabolites composed of heterocyclic ring, that have important effects on the seed germination, the growth, the stress tolerance and the crop yield.[7] Among major auxins found in plants, indole-3-acetic (IAA) and indole-3-butyric (IBA) acids have the ability to promote cell elongation in coleoptile sections and stems, cell division, differentiation of phloem elements, apical dominance, tropisms, initiation of root formation, etc.[5, 33] In order to achieve a better knowledge of the plant growth and development, auxins like IAA have been studied for their biological activities such as growth stimulation properties and stress tolerance of plants.[36]

On the other hand, macroalgae are a highly abundant marine resource that are used in several applications such as food, cosmetic, fertilizer, fuel, pharmaceuticals, wastewater treatment, and integrated aquaculture, where the worldwide annual seaweed market will be estimated to 21.1 billion USD by 2023.[79] Seaweed-based products have important potential in agriculture due to their content in biostimulant molecules and nutrients.[12, 61] Seaweed liquid fertilizer have been reported to improve the yield of the crop of around 20-30%.[80] The seaweed extract in optimum dilution (20% of Kelpak made from *Ecklonia maxima*) was demonstrated to reach comparable activity of IBA at a concentration of 10^{-5} - 10^{-4} M.[81] However, at higher concentrations than 50% of seaweed extracts made from *Ascophyllum nodosum*, a decrease in rooting was observed.[81]

Bioactive compounds are often extracted from vegetable materials using solid-liquid extraction methods like maceration, percolation, turbo-extraction, and sonication.[52]

Methods such as ultrasounds, pulsed electric field, enzyme digestion, microwave heating, ohmic heating, supercritical fluids, extrusion and accelerated solvents (ASE) are more environmental friendly extraction methods that could enhanced the yield, the quality of the extracts and the selectivity of extraction, while decreasing the consumption of solvents and the operation time.[27] ASE allows to improve extraction parameters like time, solvent consumption, yields and reproducibility. The increasing of the extraction temperature accelerates the kinetics and the high pressure forces of the solvent into the matrix that would enhance the extraction yield.[27, 52]

Recently, many publications have reported the analysis of auxins using capillary electrophoresis, immunoassays and chromatographic techniques like gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry.[61, 63, 77] As example, LC-MS method allows the quantification of 25 acidic and 18 alkaline phytohormones in rice.[49] Analytical methods are mainly developed for plant matrices,[50, 67, 82, 83] but scarce methods were developed for algae. In brown algae, phytohormones were quantified in genera *Macrocystis* (IAA, cytokinins), *Laminaria* (IAA, ABA), *Fucus* (IAA, cytokinins, gibberellins), *Ascophyllum* (IAA, ABA, cytokinins), *Sargassum* (cytokinins) and genus *Dyctiota* (polyamines).[5] IAA was also quantified in *Fucus distichus* fruiting tips and in *F. distichus* zygotes in a concentration of 9.3 ± 1.1 and 2.9 ± 1.3 ng per g fresh weight, respectively, using GC-MS after that the sample was purified by HPLC and derivatized using diazomethane.[84] These methods mostly require complex sample pre-treatments and expensive instrumentation.[50, 85]

Colorimetric methods are rapid, easily, and inexpensive quantification procedures. Ehrlich reagent (PDAB) is a versatile reagent that is used in several sectors.[86–92]

PDAB has been employed in colorimetric spot tests and test strips[93, 94] to reveal some chemical functional groups such as amines, carboxylates, aldehydes[86, 95–100], and indoles produced from tryptophan by bacteria or intracellular enzymes by condensation reactions.[61, 101] For example, PDAB is used in environment as a sensor for the detection of volatile indolic compounds and in chemistry, to transform phytohormones into an active Raman derivative.[102]:[103] In biology, PDAB is used to detect the production of indole by Enterobacteriaceae[104], the presence of a serotonin derivative in safflower seeds[105], the presence of indole resulting from the decomposition of the shrimp[106] and to quantify IAA and IBA in the whole bean sprouts and sprout cotyledon.[47,61] According to our knowledge, no colorimetric quantification method of IAA and IBA in algae was reported in literature.

In this article, we report a rapid and cost-efficient colorimetric quantification method of auxins in a marine macroalgae. The colorimetric method based on the Ehrlich's reagent was applied to *S. latissima* extracts from ASE followed by a purification and a concentration step realized by solid-phase extraction.

2. Experimental section

2.1 Reagents and instruments

The IAA and IBA standards (analytical grade) and 4-(dimethylamino)benzaldehyde (PDAB or Ehrlich reagent, ACS grade) were purchased from Sigma-Aldrich. Analytical grade methanol and other chemicals were bought from Sigma-Aldrich or Fisher Chemical. Demineralized water was obtained using a nanopure Diamond system (model D11931) from Barnstead. Solid-phase extraction (SPE) Bond Elut Plexa, a mixed-mode nonpolar polymeric anion exchanger (PAX) (bed mass of 60 mg, volume of 3 mL), cartridges were acquired from Agilent.

The centrifugations were realized with a Sigma 3-18KS centrifuge. The ASE were achieved using a Dionex ASE 200 system equipped with ASE 200 Solvent Controller and Auto ASE software. The samples were incubated in a water bath from Fisher Scientific (Isotemp 210). The absorption measurements were performed with a Biochrom Ultrospec 2100 pro UV-visible spectrophotometer with water heated cell using a wavelength range of 200-900 nm and a 1 cm glass cell. The absorption spectra were treated with the SWIFT II system control software.

2.2 Sampling

The macroalgae *S. latissima* were harvested in the Gulf of Saint Lawrence at the Merinov experimental site in Cap d'Espoir (Québec, Canada). The macroalgae were collected in full length (cut 5 cm above the end of the stipe) in May 2018, washed with water, ground roughly with Comitrol model 3600 (~3 mm), and frozen at -24 °C until use. Macroalgae were freeze-dried and ground to 0.08 mm with Fritsch Pulverisette 14 grinder.

2.3 Extraction

Macroalgae were extracted by maceration in duplicate. About 0.50 g of freeze-dried algal sample was extracted overnight with methanol (5 mL) at room temperature (rt). The suspension was centrifuged (15 min, 3500 rpm, 20°C), the supernatant was collected and the solid was reextracted during 1 h at rt with 5 mL of fresh methanol. The two extracts were then combined, and the volume was fulfilled to 15 mL with methanol.

Extraction was also realized by ASE in triplicate. The freeze-dried algal sample (0.50 g) was mixed with approximately 1 g of Celite and 2 g of Ottawa sand prior to be loaded into an 11 mL sample cell. Ottawa sand was used to fill the extra space in the cell. The ASE extraction conditions were methanol as the extraction solvent, preheat of 5 min, pressure of 1500 psi, temperature of 40°C, heating time of 5 min, flush volume of 50% of the cell volume, purge time of 60 s, two static cycles, and a static time of 5 min. The resulting extracts were stored at -40°C until the purification step.

2.4 Purification

Aqueous ammonia was added to the extraction solution to reach a concentration of 2% (w/v). The SPE cartridge was conditioned with methanol (3 mL) and water (3 mL). After, the extract (4 mL) was loaded on the SPE column previously placed on a vacuum manifold. The column was washed twice with water (2 x 2 mL) and methanol (2 x 2 mL). The extracted products were recovered with a solution of 1% formic acid in methanol (2 x 2 mL). Then, the extract was evaporated to dryness at 40°C using a nitrogen flow. Finally, the extract was dissolved in 1.00 mL of methanol for the quantification.

2.5 Quantification with the Ehrlich reaction

The quantification method of IBA was adapted from literature.[47] Briefly, all standard solutions were prepared by stepwise dilution of a stock standard solution (0.002 M) with methanol. Calibration solutions were obtained by mixing standards (0.50 mL of IAA or 0.50 mL of IBA solution), 1.00 mL of methanolic solution of PDAB (0.02 M) and 0.45 mL of aqueous HCl (5 M). Sample solutions were realized by addition of 0.45 mL of HCl 5 M, 1.00 mL of PDAB and 1.00 mL of extracts. The solutions were shaken during 10 s. For the quantification at rt, the solutions have reacted during 18 h in darkness and the absorbance was measured at 583 nm. For the quantification at 70°C, the solutions analyzed at rt were heated in a water bath during 210 min and the absorbance was measured at 583 nm.

3. Results and Discussion

The reaction with PDAB was studied to improve the understanding about this colorimetric reaction and to determine the ideal parameters of the reaction as the concentration of reagents and temperature, before to be applied to algae extracts. The reactivity of IAA, IBA, and a mixture of IAA and IBA was determined at two temperatures in the goal to quantify independently IAA and IBA by colorimetry.

3.1 Development of the analytical method

Reactions with PDAB

IAA, IBA and PDAB absorb in the ultraviolet region but do not absorb in the visible region (400-750 nm). The spectra of IAA and IBA standards in methanol show absorption bands at 290 nm and 300 nm, respectively. The spectrum of PDAB exhibits an absorption band at 340 nm.

Indole absorption bands between 250 and 300 nm could be used to quantify the auxins. However, several other algal compounds absorb in the UV region preventing the use of those UV bands for quantification. For this reason, the formation of derivatives that absorb in the visible region is needed. When the IAA or IBA reacts with PDAB, new characteristic broad absorption bands of the PDAB-IAA or PDAB-IBA derivative were observed between 450 and 650 nm with a maximum absorption wavelength at 583 nm that are suitable for colorimetric quantification of IAA and IBA in algae. Indeed, algae extracts possess a low natural absorbance at 583 nm. The use of a reaction blank allows to correct for the absorption of the extract.

Figure 24 displays the absorption spectra of PDAB-IAA and PDAB-IBA derivatives at rt and 70°C. The absorption intensity was higher at 70°C compared to rt. No absorption band was detected for the reaction between IAA and PDAB at rt. Thus, only IBA can be quantified at rt. At 70°C, both IAA and IBA react with PDAB leading to absorption bands in the visible region. At the same concentration of indole moiety, the absorbance intensity of PDAB-IAA derivative was lower than the PDAB-IBA derivative at 70°C that could be explained by lower reaction rate and molar attenuation coefficient.

Recently, studies have been realized on the reaction of PDAB with indoles showing that the reaction mechanism occurs by an electrophilic substitution.[101] The reaction appears predominantly at the β -position of the indole group. From the literature, PDAB also reacts mostly with indole moieties in a 1:2 ratio leading to a β -bis(indolyl)methane moiety.[101] The products from the reaction of PDAB with an indole derivative are shown in Figure 2.

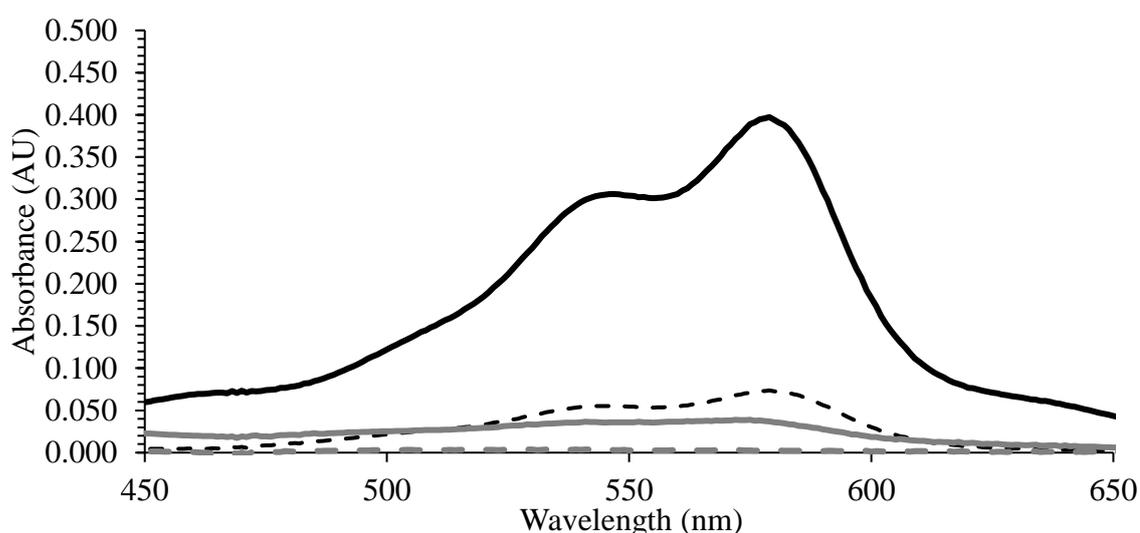


Figure 26. Absorption spectra of PDAB-IAA (grey continuous line) and PDAB-IBA (black continuous line) derivatives at 1,00 mM with 0.02 M of PDAB and 5 M of HCl at 70°C and PDAB-IAA (grey dotted line) and PDAB-IBA (black dotted line) at rt.

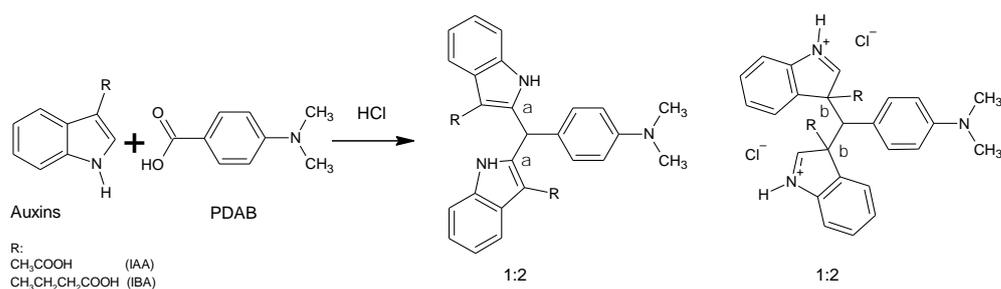


Figure 27. Formation of products from the reaction of PDAB with indole moieties

Effect of the HCl concentration

As the PDAB-IAA and PDAB-IBA derivatives are formed by an electrophilic aromatic substitution reaction, the addition of HCl in the reaction is required for the protonation of nitrogen atom of the indole ring, which catalyses the reaction with PDAB (Figure 25).[47]

The effect of the HCl concentration using fixed concentrations of PDAB (0.10 M) and indole moiety (0.4 mM of IAA and 0.4 mM of IBA) was determined. Figure 26 shows the increase of absorbance for PDAB-IAA and PDAB-IBA derivatives when the HCl concentration was increased at both temperatures.

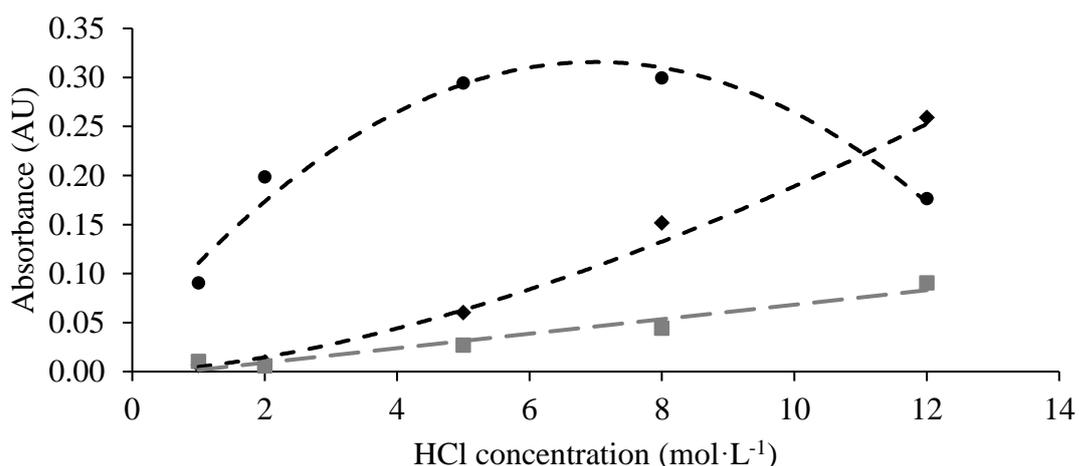


Figure 28. Variation of the concentration of HCl with PDAB 0.10 M and 0.4 mM of IBA at rt during 18 h (black diamond), IBA (black circle) and IAA (gray square) at 70°C during 210 min

When the reaction was achieved at rt, the response of PDAB-IBA derivative shows a linear dependence to the concentration of HCl. Thus, the reaction with IBA was attained a maximum absorbance at a concentration of 12 M of HCl corresponding to the highest concentration tested. At 70°C, the reaction with IBA was reached a maximum absorption intensity between HCl concentrations of 5 to 8 M. The highest absorbance was obtained at 70°C (Figure 26).

A HCl concentration of 8 M lead to a high absorbance for the PDAB-IAA derivative at 70°C without decreasing the absorbance of the PDAB-IBA derivative at rt. A concentration of HCl higher than 8 M reduced the efficiency of the colorimetric reaction involving IBA. Because IAA slightly reacted with PDAB at rt when 12 M HCl was used, the utilization of a high concentration of HCl should be avoid for the quantification of IBA at this temperature. From the above results, the HCl concentration of 5 M was chosen as the ideal concentration for the quantification of IBA.

Effect of the PDAB concentration

The concentration of PDAB affects the rate of reaction with IAA and IBA and therefore the intensity of the absorption band. Figures 27 and 28 show the effect of the variation in the PDAB concentration up to 1.0 M for the reaction with 0.4 mM of IAA and IBA standards using 5 M HCl dissolved in water and in methanol at rt and 70 °C. For the reaction of IBA with HCl dissolved in water at rt (Figure 27), the absorption intensity tended to stabilize before decreasing at a concentration of 0.020 M PDAB. Also, when IBA reacted with PDAB at 70°C, the absorbance decreased beyond a PDAB concentration of 0.1 M. For IAA at 70°, the absorbance was relatively stable, even at higher PDAB concentration.

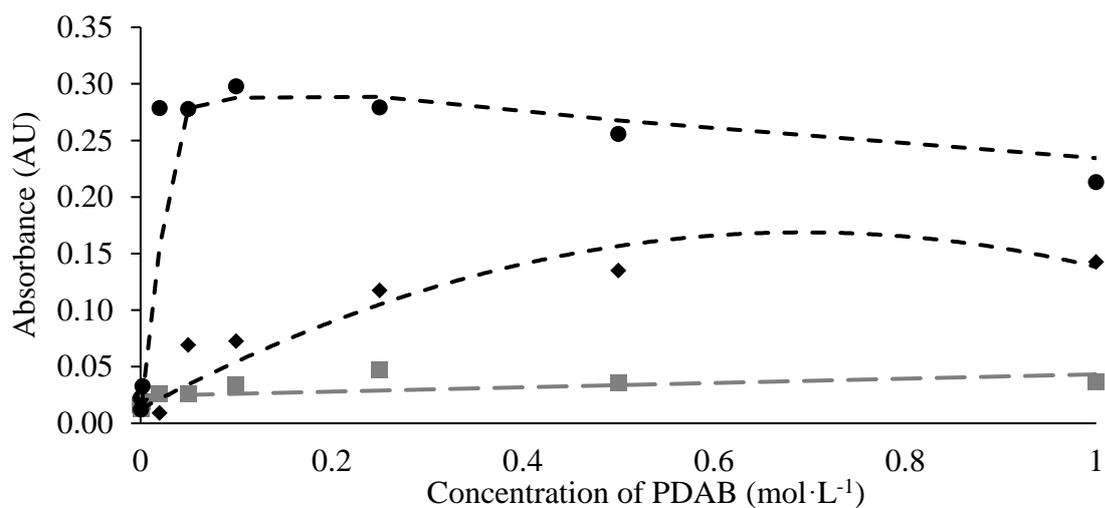


Figure 29. Variation of PDAB concentration with HCl 5 M in water on the reaction with 0.4 mM of IBA at rt during 18 h (black diamond), IBA (black circle) and IAA (gray square) at 70°C during 210 min

By contrast between Figures 27 and 28, the HCl dissolved in methanol was less efficient than when HCl was dissolved in water. This was noted by the overall decrease of absorption intensity for PDAB-IAA and PDAB-IBA derivatives at these two temperatures (rt and 70°C). The highest absorption intensity for IBA at 70°C was observed between 0.02 M and 0.10 M of PDAB. To obtain a higher absorbance, the use of an aqueous HCl solution compared to a methanolic solution was favourable. For the further analyses, an aqueous HCl solution at a concentration of 0.02 M of PDAB was used.

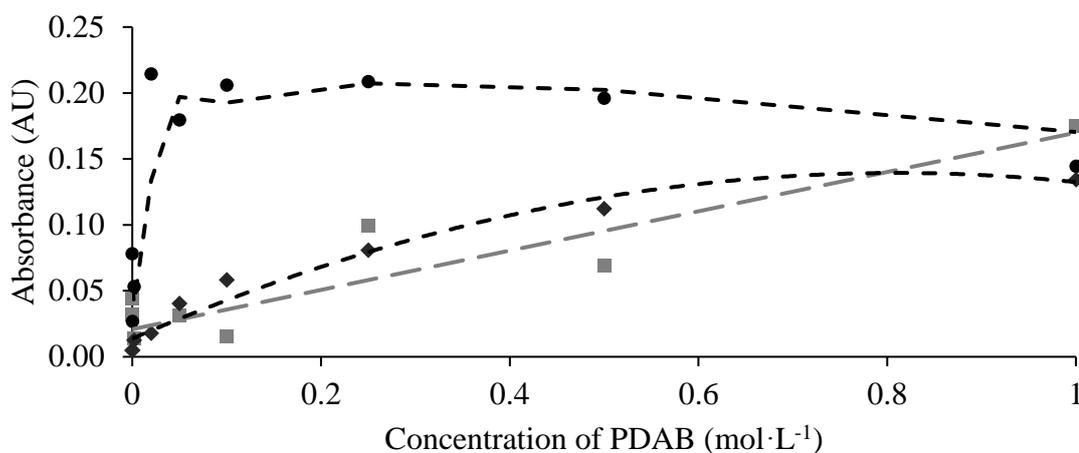


Figure 30. Variation of PDAB concentration with 5 M HCl in methanol on the reaction with 0.4 mM of IBA at rt during 18 h (black diamond), IBA (black circle) and IAA (gray square) at 70°C during 210 min

Kinetics reaction of IBA with PDAB at rt

Figure 29 shows the kinetics of the reaction of PDAB with many concentrations of IBA. The absorbance at 583 nm was proportional to the initial concentration of IBA. At low concentrations of IBA, the kinetics did not reach equilibrium after 18 h at rt, the rate of reaction appeared to be linear due to the low degree of conversion into PDAB-IBA derivative. At higher concentration (0.02 M of IBA at rt), the kinetics curve has a logarithmic shape since the reaction was almost completed after 18 h. The graph of the kinetics slope of the absorbance as a function of the concentration of IBA is linear (R^2 value of 0.9911). The reaction rate at rt is pseudo-first order with respect to the concentration of IBA.

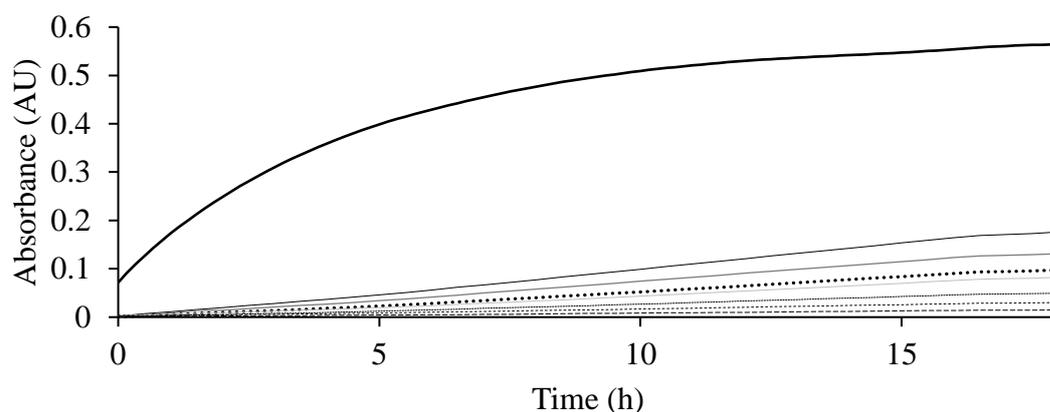


Figure 31. Kinetics of reaction measured at 583 nm with several concentrations of IBA (from top to bottom for concentration in mM: 20, 2, 1.5, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125), 0.02 M PDAB and 5 M of HCl at rt

For the quantification of IAA and IBA, the absorbance in function of the concentration must stay in the linear zone for following the Beer-Lambert law. A PDAB concentration up to 0.02 M was used to maintain the response below the unity of absorbance and to meet the previous condition. A reaction time for IBA at rt of 18 h was chosen because the reaction reached the equilibrium when a concentration of PDAB of 0.02 M was used.

Kinetics reaction of IAA and IBA with PDAB at 70°C

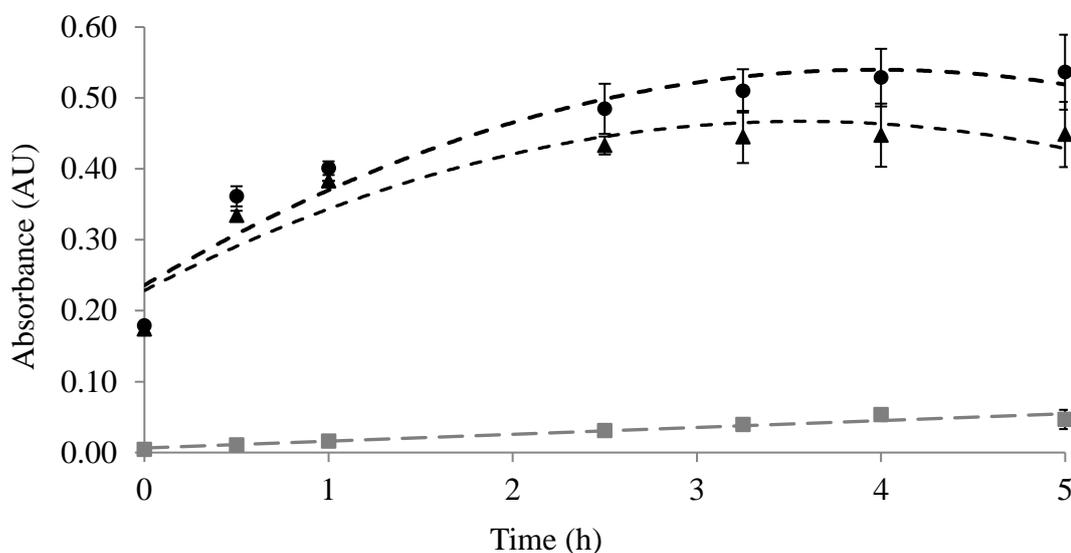


Figure 32. Kinetics of the reaction of IAA 5 mM (gray square), IBA 5 mM (black circle) and mixture of the two auxins 5 mM each (black triangle) with 0.02 M PDAB and 5 M of HCl at 70°C followed at 583 nm

Figure 30 shows the kinetics of the reaction of IAA and IBA with PDAB at 70°C. The reaction reached the equilibrium after 4 h for IAA, IBA and the mixture of the two auxins at 70°C. In addition, the response of IAA was very weak compared to those of IBA. Surprisingly, the response of IBA (5 mM) was more important than the response of the auxin mixture (5 mM IAA and 5 mM IBA). This observation could be explained by a lack of PDAB compared to the total concentration of indolic compounds. To assess this assumption, the same kinetics experiment was carried out with a PDAB concentration of 0.10 M where the results are shown in Figure 31. This higher concentration for the reaction with IBA lead to a substantial increase of the absorbance that also contributes to increasing the gap between the response of IBA and the response of the mixture of the two auxins, regardless of time. The concentration of PDAB was not limiting and the reaction time of 210 min was sufficient to attain the equilibrium.

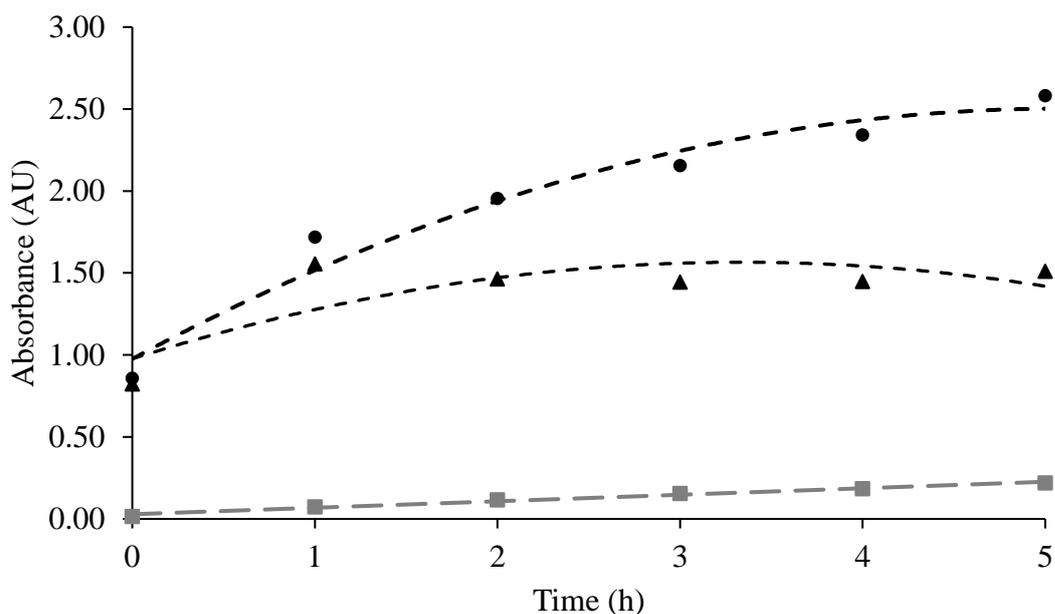


Figure 33. Kinetics of the reaction of IAA 5 mM (gray square), IBA 5 mM (black circle), and mixture of the two auxins 5 mM each (black triangle) with 0.10 M PDAB at 70°C followed at 583 nm

Therefore, the lower absorbance observed for the mixture of IAA and IBA compared to IBA alone cannot be explained by a potential lack of PDAB. As IAA and IBA can react with PDAB in a 1:2 molar ratio, a competition between IAA and IBA to react with PDAB or with PDAB derivatives having a 1:1 molar ratio could be created. In the reaction of the mixture of IAA and IBA with PDAB, several derivatives (molar ratio and substitution position) could be formed that possess different molar attenuation coefficients. The response of PDAB-IAA derivatives has a lower absorption intensity. The addition of IAA lead to the formation of PDAB-IBA-IAA that interfere with the formation of PDAB-IBA derivative in a 1:2 molar ratio, leading to a solution with a lower absorption intensity. The reaction of PDAB with the IAA and IBA mixture can form three derivatives: PDAB-IAA-IAA, PDAB-IAA-IBA and PDAB-IBA-IBA. To explain the difference that

was observed in the absorption intensity, the characterization of products from the reaction of PDAB with auxins could be realized.

As IAA and IBA have different absorption capacities when mixed with each other, after the reaction with PDAB, the quantification of IAA by subtracting by the absorbance of IBA at rt from the total absorbance at 70°C as reported by Guo *et al.*, (2010) is not suitable. For this reason, the two auxins cannot be differentiated. However, the amount of IBA can be quantified as equivalent of IBA, knowing that other compounds could interfere with the reaction involving PDAB. By performing the reaction with PDAB at rt, the amount of equivalent of IBA in an extract can be determined. This rapid and low-cost quantification method would be applied to follow rapidly a reaction or a process involving IBA.

3.2 Optimization of the analytical method applied to an algal matrix

Macroalgae represent a highly complex matrix. After the extraction step, the algae extracts were purified and concentrated in the target compounds with a SPE column before analysis to prevent colorimetric interference from other extracted compounds. The recovery rate and the analytical performance were studied for the analysis of IAA and IBA content in the *S. latissima* seaweed.

Recovery rate of IAA and IBA after a purification by SPE

In order to use a SPE column for the quantification process of auxins in algae extracts, the recovery percentages of IAA and IBA were studied. Before purification, ammonia solution was added to the extracts allowing the deprotonation of IAA and IBA and their retaining into the cationic SPE column. Coefficient of variation and percentage difference

were calculated by comparison with the initial concentration of IAA and IBA standards. The Table 1 shows that recovery percentages were quantitative (between 96 and 107%) for the both studied auxins. The coefficient of variation of the recovery percentage for IAA at 70°C is higher than for IBA which is consistent with the lower absorption response of the PDAB-IAA derivative.

Table 1. IAA and IBA recovery percentages with SPE columns using an initial concentration of 1.0 mM

Compound	Temperature	Recovery percentage (%)	Coefficient of variation (%)
IBA	rt	102	9
	70°C	107	1
IAA	70°C	96	20

Calibration curves

The quantification of IBA was realized from the absorption response of the PDAB-IBA derivative at rt. Linear relationships were obtained from nine independent calibration curves composed of around 7 points from concentrations between 0.125 and 2.00 mM for IBA standards with an average coefficient of determination of 0.983 ± 0.025 . The average slope of the calibration curves is $60 \pm 8 \text{ AU} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ and the average intercept is $0.002 \pm 0.003 \text{ AU}$. An example of calibration curve is shown in the Supporting Information.

Analysis of biomass

S. latissima is abundant in Northeastern America that favors its use for the development of new algae products. Extractions of *S. latissima* by maceration in methanol during 18 h and by ASE using methanol and two static cycles of 5 min were studied. Freeze-dried *S. latissima* was prior ground to allow a better extraction surface area.

During maceration experiments, the use of glass and plastic flasks were compared where plastic flasks gave better results. Table 2 shows the extracted concentration of IBA in *S. latissima* resulting from the extraction methods. As mentioned earlier, the results were presented in equivalent of IBA because other compounds could potentially react with PDAB. In the studied conditions, the extraction by maceration (0.30 mg of equiv. of IBA per gram of fresh weight) was largely more effective than the ASE extraction that is attributed to a longer contact time with the solvent. No IBA was detected in ASE extracts that were kept during 2 months before to be analyzed, confirming the importance of quantifying quickly after the extraction to avoid degradation.

Table 2. Extraction by maceration and ASE of *S. latissima*

Extraction method	Concentration mg equiv. IBA g ⁻¹ FW
Maceration	0.30 ± 0.08
ASE	0.060 ± 0.002

3.3 Comparison of the auxin concentration with literature

Various *Phaeophyceae* species such as *Macrocystis*, *Laminaria*, *Fucus* and *Ascophyllum* contain auxins.[5] There is a considerable variability in the auxins content which depends of the algal species, growing conditions, harvest time, extraction and analysis methods.

The auxin content in *S. latissima* was not reported in literature. In a recent article, auxins like IAA and phenylacetic acid (PAA) have been quantified by HPLC-PDA in Baltic seaweed and *Cladophora glomerata* algae extracts where concentrations up to hundreds of μg per g DW level were found.[50] Auxins were also quantified in *Laminaria japonica* and *Pyropia haitanensis* by LC-MS and the concentrations obtained were in the order of ng per g FW for IAA et PAA.[46] IBA was found in green algae like *Ulva* and *Monostoma* species at concentrations of μg IBA per g FW level, using dispersive liquid-liquid microextraction method.[76] In various commercial seaweed extracts, IBA was observed in concentration of ng per g DW.[78]

The concentration of IBA obtained in this study on *S. latissima* are generally higher compared to the literature on algae. As the extraction and the reaction with PDAB are not specific to a single auxin, some compounds could react with PDAB generating a sum of absorbances at 583 nm. Thus, the control of the reaction parameters is important, to make sure to quantify the right compound. The results demonstrate the potential of this quantification method notably for complex matrixes especially when coupled with an efficient extraction and purification methods.

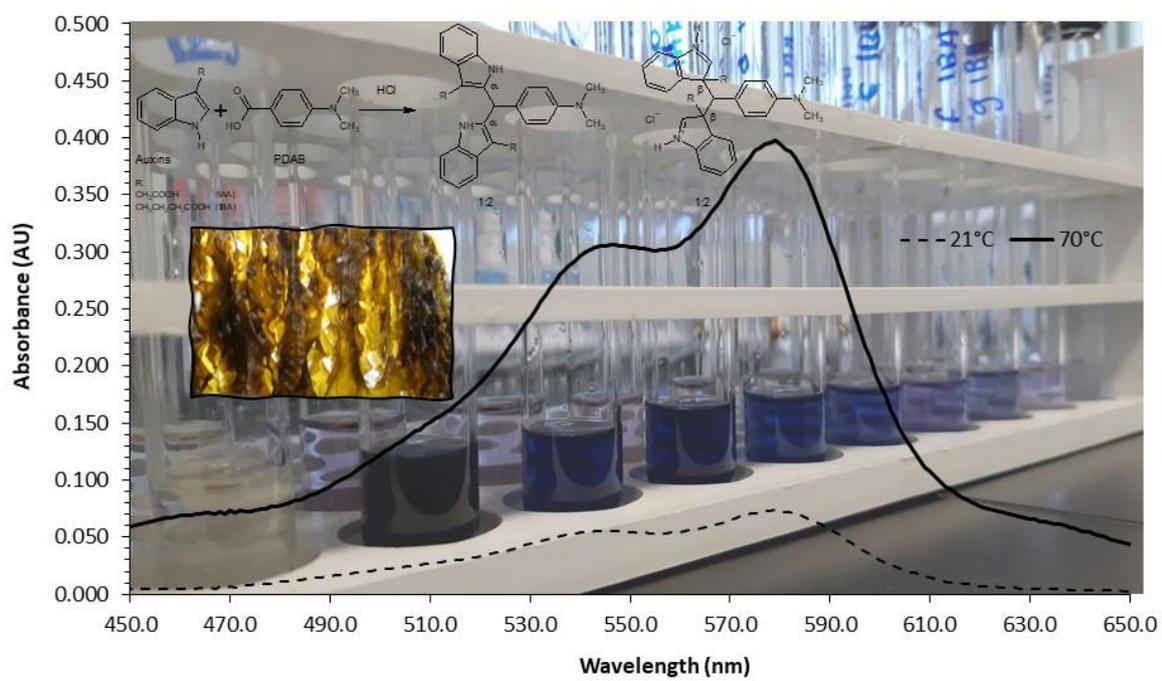
4. Abbreviation

AU : absorbance unit, ASE: accelerated solvent extraction, DW : dry weight, FW: fresh weight, HPLC – PDA: high-performance liquid chromatography – photodiode detector, IAA: indole-3-acetic acid, IBA: indole-3-butyric acid, LC–MS: liquid chromatography–mass spectrometry, PAA: phenylacetic acid, PDAB: 4-(dimethylamino)benzaldehyde, SPE: solid-phase extraction

5. Acknowledgement

We thank Arnold Blais, Marie-Élise Carbonneau and Diane Ouellet from Merinov and Marie-Eve Anglehart and Steeven Ouellet from Université du Québec à Rimouski for their technical support. We also acknowledge Mitacs for their financial support.

Graphical abstract



CHAPITRE 3

DÉVELOPPEMENTS DE MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES COUPLÉES À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Le troisième chapitre, s'intitulant « Développement de méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse », fut écrit par moi-même, accompagné de mon directeur Jonathan Gagnon. Ces résultats préliminaires sur la dérivatisation de l'IAA pour sa quantification au GC-MS et sur la séparation d'un mélange de standards de phytohormones au LC-MS ont été présentés, sous forme de présentation ayant pour titre « *Identification et quantification de phytohormones dans les macroalgues de l'est du Canada* », à la journée annuelle du Collectif de Recherche appliquée aux Bioprocédés et à la chimie de l'Environnement (CRABE) qui a eu lieu le 28 mars 2019 sous le thème: Technologies et Procédés pour la Valorisation de la Biomasse et la Protection de l'Environnement et dans le cadre de mon cours Séminaire I le 5 décembre 2019. Au départ, l'objectif était de publier un article sur les méthodes chromatographiques. Cependant, les circonstances du projet comme la disponibilité des appareils, le manque de données et de temps n'ont pas permis la rédaction d'un second article. Les résultats seront présentés sous forme de chapitre comportant un résumé, une introduction, une partie méthodologie, les résultats et discussion ainsi qu'une conclusion.

1. Résumé

Ce présent chapitre expose les démarches de mise en place de méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse pour la caractérisation et l'identification de phytohormones dans la *S. latissima*. L'objectif est de développer une méthode rapide, standardisée et simple, comparativement à ce qu'on retrouve dans la littérature, pour la détection de phytohormones. Tout d'abord, une méthode de détection de l'IAA en GC-MS a été élaborée. Le triméthylsilyldiazométhane a été utilisé comme agent méthyliant pour rendre volatil le composé ciblé. La méthode utilisée a permis de détecter la présence de IAA dans la *S. latissima*. Compte tenu de la faible limite de détection en GC-MS, des démarches ont été entreprises pour la mise au point d'une méthode d'identification et de caractérisation au LC-MS. Le LC-MS est une technique de séparation, d'identification et de quantification moderne permettant l'analyse précise de molécules bioactive. La séparation de SA, GA, K, IAA et IBA contenu dans un mélange de standards ont été possibles en utilisant une colonne C18. Les paramètres de séparation ont été optimisés pour développer une méthode rapide et efficace de 22 minutes. La répétabilité de la méthode a été étudiée et montre un écart-type faible pour SA, GA, K, IAA et IBA. Leurs coefficients de variation respectifs sont 3,29; 9,52; 2,77; 9,24 et de 13,86%. Le développement d'une méthode de séparation en LC-MS est une première étape vers l'adaptation de cette méthode pour l'analyse des phytohormones dans différentes matrices comme les algues.

2. Introduction

Les macroalgues sont une ressource marine abondante qui est utilisée comme nourriture, aliments pour animaux, engrais, cosmétique, hydrocolloïde [8]. Elles peuvent être une composante du carburant, des produits pharmaceutiques, en plus d'être utilisées pour le traitement des eaux usées et de l'aquaculture intégrée [9]. Les macroalgues sont utilisées en agriculture biologique pour leurs propriétés biostimulantes [9, 12], lesquelles proviennent entre autres des phytohormones [33].

Les phytohormones sont classées en plusieurs classes principales: acides abscisiques (ABA), auxines, brassinostéroïdes (BR), cytokinines (CTK), éthylène, gibbérellines (GA), acide jasmonique (JA), acide salicylique (SA) et strigolactones (St) [33, 34, 66]. L'ABA est produit en réponse à des stress environnementaux [38] comme la sécheresse et favorise l'inhibition de la croissance, protégeant ainsi la plante. Les auxines sont des acides carboxyliques indoliques non volatils distinguables par la chaîne qu'il possède [36]. Ils sont réputés pour stimuler la croissance des plantes soit en favorisant l'allongement de la tige [5], en favorisant la formation des racines latérales et adventives, en favorisant la régulation et la formation des fruits, en augmentant la dominance apicale, en jouant un rôle dans le phototropisme et le gravitropisme, en favorisant la différenciation vasculaire et en retardant l'abscission des feuilles [32]. Ainsi, les auxines ont un rôle important en agronomie et en horticulture. Les brassinostéroïdes et les cytokinines contrôlent, entre autres, la division cellulaire favorisant ainsi le développement des plantes [5]. L'éthylène est reconnu pour favoriser la maturation des fruits [32]. Les gibbérellines sont aussi des composés qui stimulent l'allongement des tiges et la croissance de la plante jusqu'à la phase adulte [32]. Comme l'ABA, l'acide jasmonique et l'acide salicylique sont des molécules produites qui favorisent le développement des réponses défensives de l'organisme et qui permettent entre autres de résister à l'attaque d'agent pathogène. Finalement, les strigolactones sont des stimulants de la germination [38]. Dû à ces nombreux avantages pour l'agriculture, les phytohormones sont des molécules de choix pour la formulation d'engrais, d'où l'intérêt porté à cette biomasse.

La GC-MS est une méthode particulièrement efficace pour le profilage multicible des phytohormones [68, 107] telles que les auxines, les cytokinines et les phytoalexines [66–69]. Des études de quantification de l'IAA ont été réalisées par le passé en GC-MS [67–69, 83, 108] et démontrent leur efficacité entre autres avec quadripôle [68, 82]. Compte tenu du caractère non volatil des auxines, il est important de procéder à une dérivatisation de ces composés. Pour les acides carboxyliques, deux types de procédures de dérivatisation reviennent fréquemment dans la littérature : l'alkylation et la silylation [109]. Lors de l'alkylation, un groupement alkyle soit aliphatique ou aliphatique aromatique est ajouté à un groupement fonctionnel actif (H) dans l'objectif de modifier les hydrogènes acides d'acides carboxyliques et les phénols. [109] Les produits formés vont être des éthers, esters, thioéthers, thioesters, n-alkylamines et n-alkylamides [109]. Pour ce qui est de la silylation, un groupement silyle est ajouté en substitution à un hydrogène actif, pour produire un dérivé plus volatil et stable [109]. Le groupe triméthylsilyle (TMS), $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, est un réactif polyvalent et populaire pour la caractérisation au GC-MS [36, 109]. Le diazométhane (CH_2N_2) est un réactif bien connu pour les alkylations tel la méthylation [36,68,108,109], mais il est hautement toxique, thermiquement labile et explosif [110, 111]. Pour pallier ces inconvénients, l'utilisation d'un dérivé triméthylsilyle semble être une alternative non toxique et efficace pour la méthylation [110, 111]. Le triméthylsilyldiazométhane (TMSCHN_2) est un réactif reconnu pour l'estérification depuis plusieurs années et utilisé dans la littérature pour ses avantages tels que le temps de réaction rapide [108] et les résultats quantitatifs qu'il procure [109,110]. Il va interagir avec les groupements acides carboxyliques pour ainsi former des esters méthylés. Ce type de réaction va permettre aux molécules non volatiles comportant un groupement acide carboxylique d'augmenter leur volatilité, permettant ainsi leur détection en GC-MS.

Récemment, plusieurs publications ont rapporté l'analyse des phytohormones en chromatographie liquide. Par exemple, un article récent de Cao *et al*, 2016 présente une méthode en LC-MS pour quantifier 25 phytohormones acides et 18 alcalines dans le riz [49]. Liu *et al*, 2012 a pu déterminer simultanément plus de 24 phytohormones acides et alcalines de tissus végétaux par LC-MS à ionisation d'électrons et piège à ions [48]. Ils ont utilisé une méthode d'extraction en phase solide mixte échangeuse d'anion et de

cations comme dans l'article de Dobrev *et al*, 2002 qui est un autre exemple où les cytokines sont séparées de l'auxine et de l'acide abscissique par SPE en mode mixte [112]. Spécifiquement, dans la littérature, l'utilisation de colonnes C18 est préconisée pour la séparation des phytohormones en LC [49, 50, 57, 71]. Principalement, des méthodes de quantification ont été développées pour les matrices végétales [50, 54, 67, 83, 113], mais seulement quelques méthodes ont été développées pour les algues [46, 50, 77]. Entre autres, plusieurs phytohormones ont été détectées simultanément dans les algues de la mer Baltique dans un article récent de Gorka *et al*, 2017. De l'acide phénylacétique (PAA) et de la *trans*-zéatine (*tZ*) étaient présents dans les algues de la Baltique à une concentration respective de $362,47 \pm 13,00 \mu\text{g} / \text{g}$ et $154,45 \pm 20,63 \mu\text{g} / \text{g}$ [50]. L'extrait de *Cladophora glomerata* contenait du PAA et de l'IAA en concentration de $229,30 \pm 7,90 \mu\text{g} / \text{g}$ d'extrait et $23,91 \pm 0,80 \mu\text{g} / \text{g}$ d'extrait [50]. Des composés d'IAA, CTK, GA, ABA, JA et SA ont été aussi identifiés par LC-MS dans la *Laminaria japonica* et la *Pyropia haitanensis* à des concentrations de l'ordre du $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ [46].

Ce chapitre propose une méthode simple et rapide d'estérification de l'acide indole-acétique avec du TMSCHN₂ dans la *S. latissima* pour son identification au GC-MS et une méthode sensible et efficace de séparation et de quantification de phytohormones acides (IAA, IBA, K, GA et SA) contenues dans un mélange de standards (figure 24) au LC-MS.

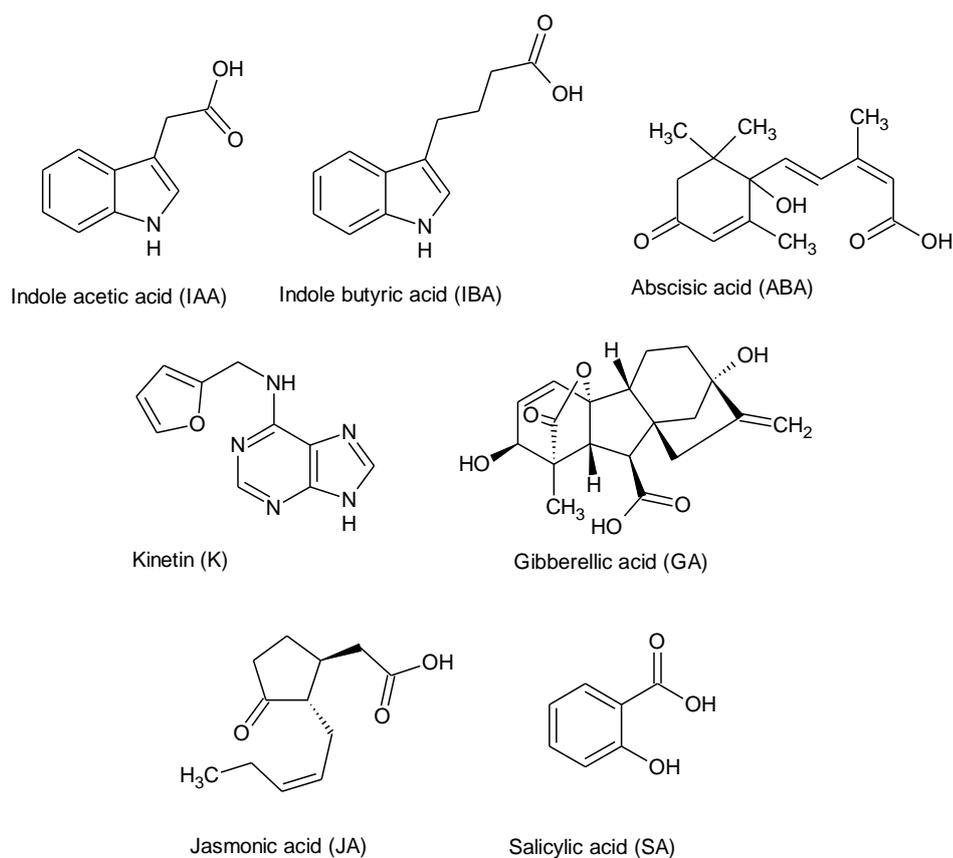


Figure 34 : Structures chimiques des phytohormones utilisées lors du développement de la méthode de quantification en LC-MS.

3. Méthodologie

a) Appareils et réactifs

Les standards ABA ($\geq 98,5\%$), GA (90%), IAA (98%), IBA ($\geq 99\%$), JA (standard analytique), SA ($\geq 99\%$) et la K ($\geq 99\%$) ont été achetés auprès de Sigma Aldrich. Le méthanol et les autres produits chimiques utilisés étaient de qualité analytique et obtenue auprès de Sigma Aldrich et Fisher Chemical. De l'eau désionisée obtenue avec un système NANOpure Diamond de Barnstead (modèle D11931) a été utilisée. Les colonnes d'extraction en phase solide (SPE) Bond Elut Plexa échangeuse d'anions polymériques non polaires (PAX) en mode mixte (60 mg, 3 mL) et les SPE échangeuse de cations polymériques non polaires (PCX) en mode mixte (60 mg, 3 mL) ont été achetées chez Agilent. L'analyse par CG-MS est effectuée avec le chromatographe de Agilent

Technologies, modèle 6850 Series II Network GC System, l'injecteur automatique de la même compagnie, modèle 6850 Series Auto Sampler, la colonne de Restek, modèle RXi®-5ms, longueur : 30 mètres, diamètre : 0,25 mm, constituant : Crossbond 5% diphenyl/ 95% dimethyl polysiloxane et le spectromètre de Agilent Technologies, modèle 5975B VL MSD. La séparation par LC-MS Orbitrap a été effectuée sur un système Accela de Thermo (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA). La colonne Phenomenex Luna 5u C18(2) 100A 150 x 2.0 mm a été utilisée avec une colonne de garde Phenomenex, 150 mm x 2 mm. La détection de masse à haute résolution (HRMS) a été effectuée sur un spectromètre de masse Orbitrap LTQ Discovery du système Thermo (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA), en mode positif et négatif. Le traitement des données a été effectué avec le logiciel Thermo Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific).

b) Échantillonnage

Les macroalgues *S. latissima* ont été récoltées dans le fleuve Saint-Laurent à Petit-Cap 49 ° 01'58.4 "N 64 ° 26'43.1" O et au site expérimental de Merinov dans la baie Paspébiac (Québec, Canada). Les macroalgues ont été collectées sur toute leur longueur (coupées à 5 cm au-dessus de l'extrémité du pied), lavées à l'eau, broyées grossièrement (~3 mm) avec Comitrol modèle 3600 à la réception et congelées à -24 °C. Les algues (~3 mm) ont été lyophilisées et broyées en particule plus fine (1,0 mm) avec Pulverisette 14 (Fritsch).

c) Extraction, purification et quantification pour l'analyse au GC-MS

Tous les composés solubles dans le méthanol sont extraits. L'extraction a pour objectif d'extraire les produits, simplifier la matrice et faciliter l'analyse. L'extraction a été effectuée avec environ précisément 2.0 g d'algues broyées (~3 mm) fraîchement décongelés dans 20 mL de méthanol froid et broyé à l'aide d'un polytron à une vitesse moyenne de 1000 RPM, pendant 30 minutes. Les manipulations de l'extraction ont été effectuées dans un tube Falcon de 50 mL qui reposait dans un bain de glace pour éviter la dégradation de la biomasse. L'extrait a été centrifugé et une deuxième extraction de 30 minutes a été faite. La solution méthanoïque (surnageant) a été évaporée à sec à l'évaporateur rotatif.

Lors de la dérivation, une réaction de méthylation a lieu avec les acides carboxyliques et le TMSCHN₂. L'extrait est solubilisé dans 2 mL de dichlorométhane. Ensuite, 2 uL de TMSCHN₂ 2,0 M dans l'hexane a été ajouté et le mélange a été vortexé et reposé 30 minutes à température ambiante. Par la suite, 2 uL d'acide acétique 2,0 M dans l'hexane a été ajouté au mélange, vortexé et reposé 30 minutes. Une fois la réaction terminée, la phase organique a été retirée par évaporation à sec et l'échantillon a été conservé à 4°C.

L'extrait dérivé est purifié par extraction liquide-liquide avec 4 mL d'eau et 800 uL de toluène. Une fois centrifugée, une deuxième extraction est effectuée et la phase organique (toluène) est récupérée. Ensuite, les pigments sont retirés en éluant l'extrait sur une colonne de silice. Avant l'analyse, l'échantillon est séché avec une colonne de sulfate de magnésium. Les paramètres et les conditions d'analyse au GC-MS sont résumés dans le tableau suivant (tableau 12).

Tableau 9 : Paramètres et conditions d'analyse de l'IAA par GC-MS [67].

Paramètres	Description
Appareil utilisé	GC Agilent Technologies
Volume injecté	1 µL Mode splitless
Gaz porteur	Hélium de haute pureté
Débit	1 mL/min
Colonne	Restek Rxi-5MS 30 m de long, 250 µm de diamètre et 0,25 µm d'épaisseur de phase stationnaire
Température	Injection à 280°C Température de la colonne : 80°C Maintien durant 2 minutes Augmentation de 30°C/min pendant 4 minutes jusqu'à 200°C Augmentation de 5°C/min pendant 6 minutes jusqu'à 230°C Augmentation de 30°C/min pendant minutes jusqu'à 270°C Maintien pendant 2 minutes
Détecteur	MS quadripôle Température du détecteur quad: 150°C Température d'ionisation: 230°C Énergie d'ionisation: 70 eV Numérisation de 50,0 m/z à 550,0 m/z

d) Extraction, purification et quantification pour l'analyse au LC-MS

Les phytohormones ont été extraites d'un échantillon d'algues en triplicata à l'aide du système d'extraction de solvant accéléré Dionex ASE ® 200 avec contrôleur de solvant ASE 200 utilisant le logiciel AutoASE pour ASE 200. Des échantillons d'algues broyées (~1 mm) séchées (0,50 g) ont été mélangés avec environ 1 g de célite et 2 g de sable d'Ottawa avant d'être chargés dans des cellules d'échantillonnage de 11 mL. Du sable d'Ottawa a été utilisé pour remplir l'espace supplémentaire dans la cellule. Les conditions d'extraction pour l'ASE étaient : 5 min de préchauffage, pression de 1500 psi, température de 40 ° C, temps de chauffe de 5 min, volume de rinçage de 50% du volume de la cellule, temps de purge de 60 s, 2 cycles et temps statiques de 5 min. Les extraits résultants ont été entreposés à -40 °C avant purification.

Les phytohormones ont également été extraites d'un échantillon d'algues en triplicata par macération pour comparaison avec l'ASE. Tout d'abord, environ précisément 0,50 g d'échantillons d'algues lyophilisées ont été extraits pendant 16h avec du méthanol (5 mL) à la température ambiante (tp) et à 40°C. La suspension a été centrifugée, collectée et re-extraite pendant 1h00 à tp ou 40 °C avec 5 mL de méthanol frais. Ensuite, les deux extraits ont été combinés et le volume a été comblé à 10 mL avec de l'eau.

Purification - Cartouche PAX

La méthode de purification des phytohormones a été adaptée de la littérature [49]. Brièvement, la première étape consiste à prétraiter l'échantillon. Du NH₄OH est ajouté à la solution de l'extrait pour atteindre une concentration finale de 2% dans l'échantillon. Avant d'ajouter l'extrait sur les cartouches, les colonnes SPE sont conditionnées avec du méthanol et de l'eau. Ensuite, 4 mL d'extrait brut ont été chargés dans des cartouches SPE Bond Elut Plexa PAX (60 mg, 3 mL) qui ont été placées sur un collecteur sous vide. La cartouche SPE a été lavée deux fois avec de l'eau (2 x 2 mL), deux fois avec du méthanol (2 x 2 mL) et éluées avec deux portions de méthanol contenant 1% d'acide formique (2 x 2 mL). Ensuite, les extraits purifiés ont été évaporés à sec à 40°C en utilisant un flux d'azote. Enfin, les extraits ont été dissous dans 0,50 mL de méthanol pour quantification.

Purification - Cartouche PCX

De l'acide formique a été ajouté dans la solution de l'extrait pour atteindre une concentration finale de 2% dans l'échantillon. Le conditionnement et le changement des cartouches sont réalisés comme dans la section précédente (cartouche PAX), mais sur des cartouches SPE Bond Elut Plexa PCX (60 mg, 3 mL). La cartouche SPE a été lavée deux fois avec 2 mL d'eau avec 0,1% de HCO₂H, deux fois avec du méthanol (2 mL) et éluées avec deux portions d'une solution de méthanol contenant 0,5% de NH₄OH (2 mL). Ensuite, les extraits PCX purifiés sont traités comme pour les extraits de la section précédente (cartouche PAX).

Lors de la séparation chromatographique, la phase mobile était constituée d'acétonitrile et d'une solution aqueuse d'acide formique 5 mM de formate d'ammonium à pH 5. Un gradient a été utilisé pour l'analyse, 0–15 min, 5:95 de CH₃CN : HCO₂H/H₂O (v / v); 15–20 min, 70:30 (v / v); 20–22 min, 5:95 (v / v). Le pH de la phase aqueuse a été maintenu à 5. Le débit était de 500 µL / min et 10 µL d'échantillon étaient chargés sur la colonne avec une seringue de diamètre de 2.30 mm. La température de la colonne a été maintenue à tp. Les paramètres MS sont les suivants : la source d'injection est de type ESI, la température du capillaire est de 300°C, le débit de gaz de gaine est 55,00 (arb) et le débit de gaz auxiliaire 10,00 (arb). En mode polarité négatif, la tension de la source est à 3.20 kV, le courant de source est de 100.00 uA et la tension capillaire est de -38.00V. En mode positif, la tension de la source est à 4.50 kV, le courant de source est de 100.00 uA et la tension capillaire est de 19 V. Les paramètres pour l'ionisation à pression atmosphérique (API) sont les suivants : tension de source de 3,23 kV, le courant de la source de 7.32 uA et la température du vaporisateur de 972.83°C. La détection a été effectuée avec un spectromètre de masse avec source de fragmentation de 15V. Le tableau 10 rassemble l'information sur les masses exactes des phytohormones et leurs ions précurseurs.

Tableau 10 : Information sur les ions précurseurs à l'étude

Composés	Masse exacte	Ions précurseurs (m/z)*	
	g/mol	Positif (+)	Négatif (-)
IAA	175,0633	176,0711	174,0555
IBA	203,0946	204,1024	202,0868
Sa	138,0317	139,0395	137,0239
GA	346,1416	347,1494	345,1338
K	215,0807	216,0885	214,0729
JA	211,28037	212,2882	210,2725

*m/z : ratio masse sur charge

4. Résultats et discussion

4.1 GC-MS

Une fois injecté au GC-MS, le standard IAA dérivé possède un temps de rétention de 9.156 min. Les deux fragments majoritaires associés à IAA sont ceux d'IAA-dérivé à 189.1 et d'IAA-fragmenté à 130.1 (figure 35). Ces deux fragments majoritaires ont été utilisés pour détecter la présence d'IAA dans les extraits de *S. latissima* dérivée en mode SIM (selecte ion mass) (figure 36).

Malheureusement, il n'a pas été possible de quantifier l'IAA dans l'extrait d'algues. L'intensité des fragments majoritaires de IAA était trop faible pour identifier les composés de façon quantitative. La méthode de dérivatisation peut aussi être le facteur limitant de la quantification. Ce paramètre n'a pas été étudié, car nos efforts ont été davantage mis sur la méthode colorimétrique. De plus, compte tenu de la faible résolution au GC-MS, le LC-MS a été envisagé pour la caractérisation de l'IAA et de quatre autres composés.

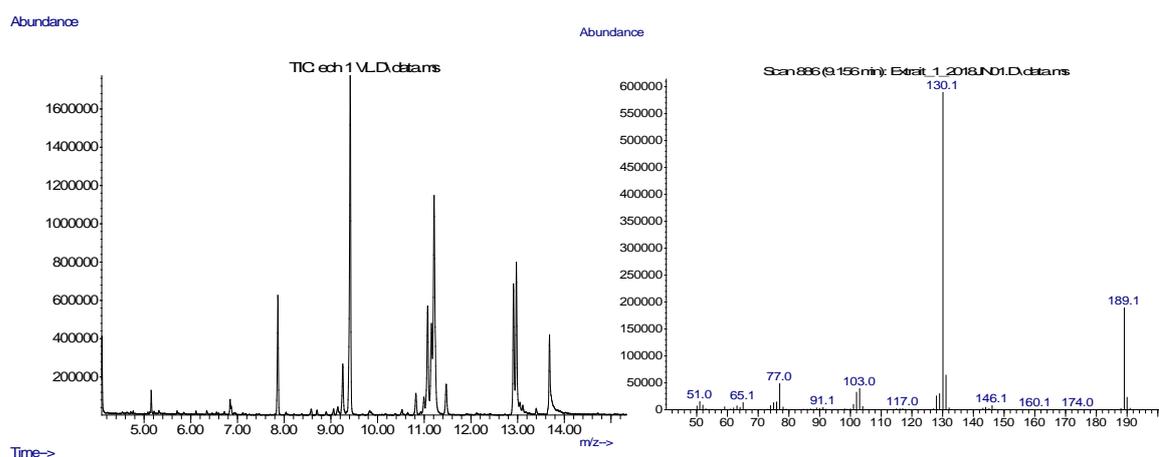


Figure 35 : Chromatogramme et spectre de masse du standard IAA issus des analyses GC-MS

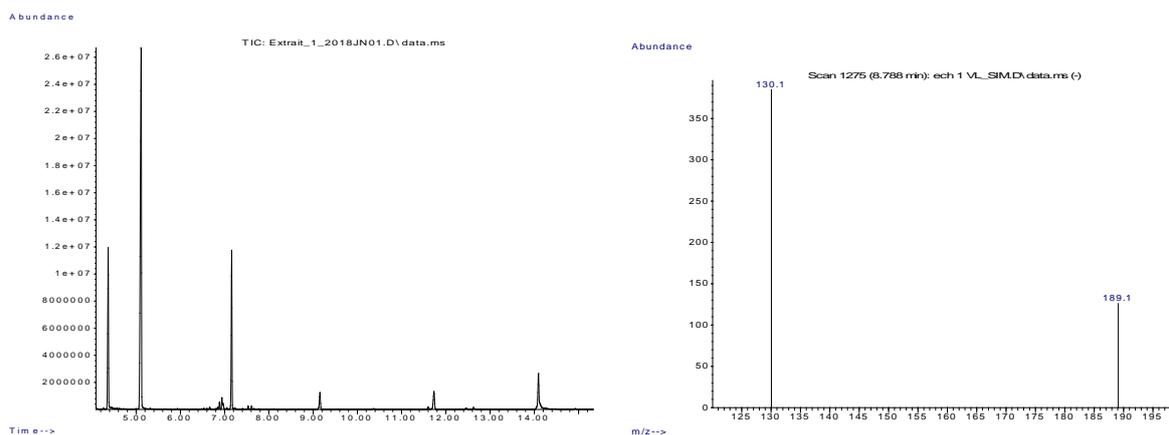


Figure 36 : Chromatogramme de l'extrait d'algue dérivé et spectre de masse en mode SIM (130.1 et 189.1) issus des analyses GC-MS

4.2 LC-MS

Cinq composés différents contenus dans un mélange de standards ont été séparés avec la méthode développée en LC-MS. Cependant, ABA et JA n'ont pas été identifiées dans le mélange de standards. La figure 37 montre un chromatogramme du mélange de standards préparés pour l'analyse des phytohormones.

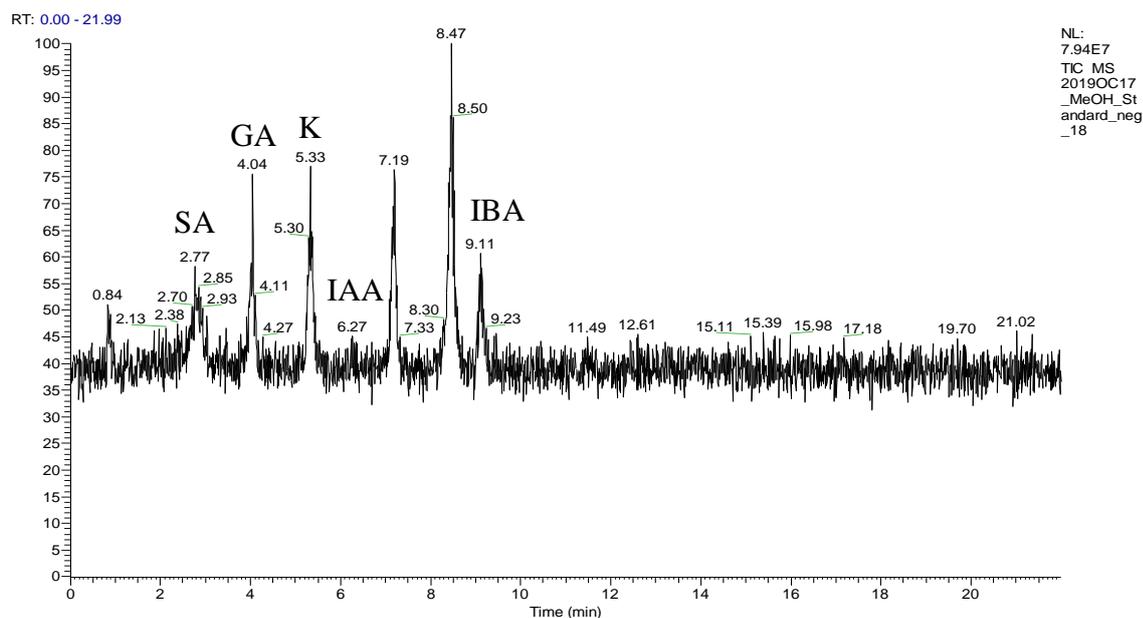


Figure 37 : Chromatogramme du mélange de standards SA, GA, K, IAA et IBA aux concentrations respectives de 21,0; 19,3; 11,6; 11,2; 13,6 $\mu\text{g/mL}$, issus des analyses LC-MS

En utilisant les masses des ions précurseurs (Tableau 11) en mode négatif, il est possible d'extraire de l'information de la figure 37. La figure suivante montre les pics de base des différents standards utilisés dans le mélange de standards.

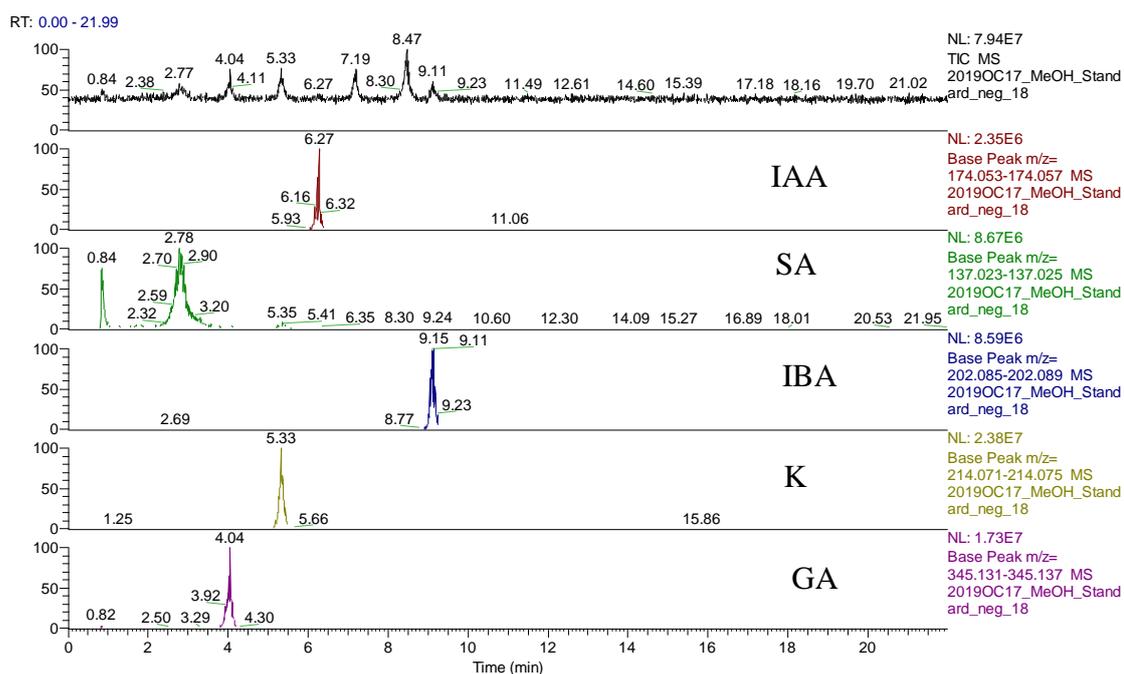


Figure 38 : Chromatogramme de chaque pic de base des standards SA, GA, K, IAA et IBA en utilisant une gamme de masse pour l'indentification, issus des analyses LC-MS

Avec les paramètres optimaux de séparation présentée dans la méthodologie, il a été possible d'étudier la linéarité d'un standard combiné contenant SA, GA, K, IAA et IBA. Le tableau suivant présente le domaine de linéarité étudié, l'équation de la droite de calibration, le coefficient de corrélation et le temps de rétention associé à chaque composé.

Tableau 11 : Droite de calibration et domaine de linéarité

Composés	Domaine de linéarité étudié	Droite de calibration	Coefficient de corrélation	Tr* (min)
SA	0,021 – 21,000 µg/mL	$Y = -140317 + 8,11353e+6x$	0,9781	2,81
GA	0,075 – 19,300 µg/mL	$Y = -214756 + 4,92381e+6x$	0,9908	4,04
K	0,011 – 11,600 µg/mL	$Y = -184062 + 1,60317e+7x$	0,9693	5,32
IAA	0,350 – 11,200 µg/mL	$Y = -231997 + 796801x$	0,9965	6,24
IBA	0,053 – 13,600 µg/mL	$Y = -174230 + 4,21798e+6x$	0,9861	9,12

*Tr : Temps de rétention (minutes)

Le tableau ci-dessous présente la répétabilité pour SA, GA, K, IAA et IBA. Le standard combiné a été injecté à cinq reprises afin d'obtenir l'écart-type et le coefficient de variation sur les mesures.

Tableau 12: Répétabilité de la méthode (n=5)

Composé	SA	GA	K	IAA	IBA
Moyenne (µg/mL)	2,792	2,505	1,637	1,367	1,484
Écart-type	0,092	0,238	0,045	0,126	0,206
CV	0,0329	0,0952	0,0277	0,0924	0,1386
%CV	3,29%	9,52%	2,77%	9,24%	13,86%

L'écart-type est faible pour SA, GA, K, IAA et IBA. Leurs coefficients de variation respectifs de 3,29; 9,52; 2,77; 9,24 et de 13,86% se situe en dessous de 15%. Ces composés peuvent être identifiés avec précision.

L'orbitrap a été choisi pour sa précision dans la détermination des masses exactes des ions fragmentés et pour son aptitude à identifier plusieurs composés à la fois. Comparativement, à ce qu'on retrouve dans la littérature, cette méthode est compétitive sur le temps de séparation. En effet, la méthode de séparation et de quantification dure un total de 22 min par échantillons pour l'analyse de 5 phytohormones (SA, GA, K, IAA et IBA). Généralement, les méthodes de séparation de phytohormones présentées dans la littérature ont une durée supérieure à 30 minutes. En comparaison, le temps requis pour séparer 10 composés (GA3, IAA, ABA, SA, JA, PAA, IPA, ZR, glycine bêtaïne et trigonelline) est de 35 min dans l'article proposé par Wang *et al*, 2014 [46]. Dans l'article de Górká *et al*, 2017, la méthode proposée pour séparer 9 phytohormones différentes (TZ, KA, IA6-BA, PAA, IAA, ABA, IBA et NAA) de matrice algale est d'une durée de 30 min [50]. Plus il y a de composés semblables, plus la séparation est difficile et la durée de la méthode va être impactée.

5. Conclusion

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude n'ont pas mené à davantage d'informations en GC-MS, car la concentration en auxine dans les macroalgues est très faible et les capacités du GC-MS ne permettaient pas de quantifier le produit. Tout de même, il a été possible d'identifier de façon qualitative la présence d'IAA dans les extraits d'algues de *S. latissima*. Pour continuer sur cette voie de quantification, la technique d'extraction, de méthylation, de purification, ainsi que les paramètres d'injection et de séparation devraient être optimisés.

En revanche, une méthode analytique rapide d'identification et de quantification a été développée au LC-MS en utilisant un standard combiné. Elle permet de séparer et de quantifier SA, GA, K, IAA et IBA contenu dans un mélange de standards avec précision. Les travaux réalisés en LC permettent de répondre seulement à une partie des objectifs spécifiques. Il n'a pas été possible de quantifier les phytohormones dans des extraits d'algues et dans le suivi de concentré liquide d'algues à l'échelle pilote. En effet, les limitations seront discutées dans la conclusion générale. Cependant, une des hypothèses a été validée. Le LC-MS permet d'identifier les phytohormones, et ce, en utilisant une colonne C18 pour la séparation. Ce chapitre propose tout de même une méthode d'extraction et de purification des algues qui pourrait éventuellement être testée pour l'analyse des composés énumérée ci-dessus.

Cette méthode au LC-MS pourra être utilisée et adaptée dans d'éventuel projet d'identification de phytohormones. Il faudra d'abord valider la méthode avec des échantillons pour être sûr de la validité analytique. En effet, ceci est un point de départ analytique pour le suivi de méthodes d'extraction et la quantification des phytohormones dans les algues. Les travaux futurs pourront ainsi se concentrer sur l'identification des composés dans une matrice algale.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les recherches effectuées dans le cadre de ce mémoire de maîtrise s'insèrent dans le domaine de valorisation des macroalgues de l'Est du Canada qui sont actuellement un potentiel commercial sous-exploité. La présence de ces organismes en abondance dans les eaux de l'Est du Canada est un incitatif considérable à l'implantation de méthode d'extraction et de formulation de nouveaux produits. Les phytohormones issues des algues ont un potentiel de valorisation important en agriculture. Actuellement, les travaux sur les phytohormones d'algues sont peu nombreux comparativement à ce qui se fait sur les phytohormones de plantes terrestres. Le développement de méthodes d'extraction et de quantification spécifiquement adaptées pour une matrice complexe comme les algues est donc très pertinent pour favoriser l'exploitation de cette biomasse.

Ce mémoire a permis de développer un outil rapide et peu coûteux de suivi des auxines dans les macroalgues de l'Est du Canada en colorimétrie. Pour la première fois, à notre connaissance, le réactif d'Ehrlich (PDAB) a été utilisé sur une matrice algale dans l'objectif de quantifier les auxines. Les résultats ont démontré le potentiel de la méthode colorimétrique pour la détection d'IAA et IBA, notamment dans des matrices complexes comme les algues telles la *S. latissima*, en particulier lorsqu'elle est couplée à SPE et à une méthode d'extraction efficace. Plus précisément, dans le cadre de ces recherches, la réaction du groupement indole, présent dans les composés de la classe des auxines, avec le PDAB a été étudiée à différents niveaux sur l'IAA et l'IBA. Cela nous a permis de découvrir que IAA et IBA sont des chromophores ayant des coefficients d'absorption molaire différents qui forment une bande d'absorbance de différente intensité à 583nm. De plus, nous avons découvert que IAA interfère lors de la quantification colorimétrique de IBA et l'interférence provient probablement d'un composé PDAB-IAA-IBA (ratio 1 :2). Étant donné que les composés de la classe des auxines se ressemblent dû à la présence de groupement indole dans leur structure, nous supposons qu'ils auront tous tendance à réagir en moyenne comme IAA et IBA pour former un complexe avec le PDAB. C'est pour cette raison que la méthode développée en colorimétrie devient intéressante; c'est un outil de quantification pour déterminer le contenu moyen en auxines dans les algues. Cependant, la formation de composés PDAB-IAA-IBA est une observation importante à considérer lorsque le PDAB est utilisé de manière quantitative

sur les auxines dans de nombreux secteurs. L'interférence créée peut induire une erreur dans l'interprétation des résultats.

L'influence du changement de concentration en réactif (PDAB) et en catalyseur (HCl) aqueux et organique a été étudiée. Cela a permis d'établir les concentrations idéales en réactifs pour la quantification moyenne des auxines. De plus, la cinétique de la réaction à deux températures différentes (température ambiante et 70°C) dans les concentrations idéales en réactif a été étudiée pour déterminer le temps idéal de réaction à chaque température (4h et 18h). Nous avons aussi pu déterminer que le chauffage de la solution apporte un gain au niveau de l'absorbance des standards, mais une diminution de l'absorbance des échantillons. Les algues sont des matrices complexes qui peuvent comporter des substances qui vont interférer lors de l'analyse. De plus, les phytohormones, comme les auxines, sont des composés thermolabiles, ce qui peut aussi expliquer la perte d'absorbance dans les échantillons de *S. latissima*. Nous avons aussi testé la performance des cartouches de purification SPE PAX qui ont démontré une très grande performance et efficacité pour retenir IAA et IBA. Finalement, une fois les paramètres optimaux de quantification et de purification étudiés, nous avons testé l'extraction par macération à température pièce et l'ASE avec une matrice lyophilisée et broyée de *S. latissima*. Contrairement à ce qu'on supposait, l'ASE n'a pas permis d'extraire plus d'auxine que l'extraction par macération. En fait, une température de 40°C et l'application de forte pression ont peut-être endommagé les composés ciblés pour l'extraction. L'extraction par macération est donc le type d'extraction qui a démontré une plus grande efficacité d'extraction. Nous obtenons des concentrations de $0,30 \pm 0,08$ mg·g⁻¹ en équivalent IBA chez *S. latissima* avec les meilleures conditions expérimentales: broyage à 0,08 mm, extraction par macération dans l'obscurité à rt, purification sur cartouche SPE et réaction d'Ehrlich à rt pour ne pas endommager la matrice. Ainsi, les prochains travaux sur les auxines dans les algues pourront être effectués avec une méthode simple et peu coûteuse d'extraction, de purification et de quantification. En utilisant une méthode uniformisée, il sera possible de suivre le développement de concentré liquide d'algue.

La dérivatisation d'un standard d'acide indole-acétique a été mise au point et il a été possible de l'appliquer sur un extrait d'algue. Cette méthode a permis d'identifier de

façon qualitative la présence de IAA dans la *S. latissima* au GC-MS. Cependant, la méthode de méthylation doit être optimisée afin de pouvoir quantifier cette hormone au GC-MS. Dans le cadre de ce projet, l'investigation de meilleures conditions de dérivation n'a pas été effectuée. Les efforts ont davantage été mis sur le développement de la méthode colorimétrique afin de répondre à un besoin industriel de suivi des phytohormones dans les algues. Tout de même, la détection d'IAA au GC-MS, permet de vérifier la présence de cette auxine dans les algues.

Mes travaux effectués en LC-MS Orbitrap ont été utiles dans le développement d'une méthode de séparation et d'identification de différentes classes de phytohormones contenues dans un mélange de cinq standards (SA, GA, K, IAA et IBA). Cette méthode a un potentiel d'application considérable au Québec considérant que le seul laboratoire au Canada offrant un service analytique aux entreprises (Aquatic and Crop resource Development, Conseil national de recherches du Canada (CNRS), Saskatoon) se situe à Saskatoon. La méthode en LC peut servir de point de départ pour l'analyse des algues au Québec. En outre, les recherches ont permis d'étudier la linéarité de la calibration pour un large domaine de concentration pour chacun des standards. De plus, nous avons étudié la répétabilité de la méthode, une fois les paramètres optimaux de séparation et de quantification établis. L'application de cette méthode d'analyse pourra être éventuellement adaptée pour différentes matrices.

Finalement, une petite partie du projet a été consacrée à mettre au point un procédé d'extraction à l'échelle semi-pilote à la demande d'une entreprise privée québécoise en partenariat avec Merinov. L'entreprise souhaitait développer un extrait d'algues concentré en phytohormones pour produire un fertilisant biologique et efficace. Des analyses externes ont révélé que les extraits liquides d'algues produits selon les procédés développés contenaient bien des phytohormones. L'entreprise a aussi créé un bio-charbon enrichi en nutriments de source algale qui démontrait un impact positif sur la croissance de plants de tomates. Ceci n'est qu'un exemple d'entreprise québécoise intéressée à la valorisation des algues dans le domaine agricole. D'autres entreprises québécoises établies, comme Pro-Algues Marine et Organic Océans proposent déjà des produits fertilisants à base d'algues. Il y a un intérêt considérable pour la valorisation des algues dans le domaine agricole au Québec. Cependant, il n'a pas été possible de suivre et

d'optimiser le processus industriel d'extraction avec les méthodes développées dans le cadre de ce mémoire. Le développement de la méthode industrielle a été fait au début du projet de maîtrise, avant que le développement analytique ne soit complété. En revanche, les procédés développés pourraient être implantés à l'avenir dans les entreprises comme étape de contrôle de qualité lors de la production.

Limites du projet

Plusieurs questions restent en suspens et des études supplémentaires permettraient de répondre à ces limites. Le développement analytique en colorimétrie a été priorisé dans le cadre de ce projet et il n'a pas été possible de caractériser le contenu des algues avec la méthode LC. Des facteurs limitants, tels que l'indisponibilité de l'appareil (LC-MS), le manque de personnel pour le maintien en opération de celui-ci et des contraintes de temps, ont eu un impact négatif sur le développement des méthodes analytiques en LC.

Une seule espèce d'algue a été utilisée; *S. latissima*, pour le développement analytique. Des études élargies avec une plus grande diversité d'espèce d'algues seraient un atout pour la valorisation subséquente des ressources algales québécoises. Dans le même ordre d'idées, une comparaison des différentes méthodes analytiques permettrait d'appuyer la validité des méthodes.

La variation des teneurs en phytohormones, qui dépend des espèces, des conditions saisonnières et de l'environnement, est aussi un phénomène limitant. En effet, cela rend plus complexe la comparaison des résultats avec la littérature. De plus, il est aussi plus difficile de comparer les résultats lors du développement des méthodes lorsque des algues ont été échantillonnées à différents moments de l'année et lorsqu'elles ne sont pas analysées tous au même moment. Ainsi, des recherches plus précises sur l'évolution des concentrations en auxine dans le temps et en fonction des saisons seraient intéressantes pour déterminer quel moment de l'année prioriser pour l'échantillonnage.

Il n'a pas été possible de suivre les quantités de phytohormones dans la mise au point du procédé industriel de Merinov dans le cadre de ce projet. En effet, le suivi de la méthode industrielle n'a pas pu être fait, car les échantillons des lots de production étaient trop vieux lorsque le développement analytique fut terminé.

Travaux futurs / perspectives

L'intérêt porté à la valorisation de la biomasse algale sera, dans les prochaines années, un incitatif important pour la recherche dans ce domaine. Les recherches menées dans ce mémoire mènent à réfléchir sur les étendues possibles du projet. En effet, avec les méthodes analytiques développées soit en colorimétrie, LC-MS ou encore en GC-MS, il sera possible de faire le suivi lors du développement de procédé industriel de valorisation des algues. Cet objectif n'a pas pu être atteint dans le cadre de ces travaux dus, entre autres, à la quantité limitée de biomasses disponible, la conservation de celle-ci et aux délais importants qu'a nécessité la mise à place des méthodes analytiques. Donc, pour les travaux futurs, il sera important d'axer les recherches sur l'application et l'adaptation des méthodes pour des matrices algales.

De plus, la caractérisation et la comparaison des différentes espèces de macroalgues sont un aspect qui mérite d'être considéré dans les travaux futurs. Dépendamment de leur teneur en phytohormones, certaines algues pourraient être priorisées par rapport à d'autres pour la valorisation agricole et horticole. En conclusion, les perspectives de valorisation des algues sont considérables et les phytohormones ont un fort potentiel de commercialisation dans le domaine agricole.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Stirk, W. A. & Staden, J. V. (1998). *Seaweed Products As Biostimulants in Agriculture*; South Africa Chemical.
- [2] Calvo, P. Nelson, L. & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural Uses of Plant Biostimulants. *Plant and Soil*. 383 (1–2), 3–41.
- [3] Arioli, T. Mattner, S. W. & Winberg, P. C. (2015). Applications of Seaweed Extracts in Australian Agriculture: Past, Present and Future. *J. Appl. Phycol.* 27 (5), 2007–2015.
- [4] Nabti, E. Jha, B. & Hartmann, A. (2017). Impact of Seaweeds on Agricultural Crop Production as Biofertilizer. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 14 (5), 1119–1134.
- [5] Tarakhovskaya, E. R. Maslov, Y. I. & Shishova, M. F. (2007). Phytohormones in Algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 54 (2), 163–170.
- [6] Tivendale, N. D. & Cohen, J. D. (2015). Analytical History of Auxin. *J. Plant Growth Regul.* 34 (4), 708–722.
- [7] Khan, W. Rayirath, U. P. Subramanian, S. Jithesh, M. N. Rayorath, P. Hodges, D. M. Critchley, A. T. Craigie, J. S. Norrie, J. & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *J. Plant Growth Regul.* 28 (4), 386–399.
- [8] Chabot, R. & Rossignol, A. (2003). *Algues et Faune Du Littoral Du Saint-Laurent Maritime: Guide d'identification*; Institut des sciences de la mer de Rimouski, Pêches et Océans Canada, Institut Maurice-Lamontagne: Mont-Joli.
- [9] Lionard, M. Tamigneaux, É. Gendron-Lemieux, I. & Berger, K. (2014). *Présentation Du Potentiel d'utilisation de La Biomasse Algale Sur La Côte-Nord*; Québec.
- [10] OGSL Carte interactive; biodiversité. [En ligne]. Disponible à: <https://ogsl.ca/bio/>. [Consulté le Jun 3, 2019].
- [11] MarketsandMarkets Commercial seaweeds market by type (red, brown, green), form (liquid, powdered, flakes), application (agriculture, animal feed, human food and others), and by region- Global forecasts to 2021. [En ligne]. Disponible à: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/commercial-seaweed-market-152763701.html>. [Consulté le Jan 12, 2018].
- [12] Craigie, J. S. (2011). Seaweed Extract Stimuli in Plant Science and Agriculture. *J. Appl. Phycol.* 23 (3), 371–393.
- [13] OGSL Algues – Espèces | OGSL. [En ligne]. Disponible à: <https://ogsl.ca/fr/biodiversite/algues/cric-merinov/especies>. [Consulté le Jan 22, 2018].
- [14] Sharp, G. Allard, M. Lewis, A. Semple, R. & Rochefort, G. (2008). The Potential

- for Seaweed Resource Development in Subarctic Canada; Nunavik, Ungava Bay. *J. Appl. Phycol.* 20 (5), 491–498.
- [15] Gendron, L. Gauthier, P. & Savard, G. (2007). *Expériences Préliminaires de Culture de l'algue Brune Laminaria Longicuris En Laboratoire et En Mer Au Large de Paspébiac (Québec) En 2006*; Mont-Joli (Québec).
- [16] Merinov (45) La culture de la laminaire sucrée au Québec - YouTube. [En ligne]. Disponible à: https://www.youtube.com/watch?v=GxB_R6mTXt0. [Consulté le Feb 1, 2018].
- [17] Merinov (2016). *Programmation Des Activités 2016-2019. Bilan Des Consultations*.
- [18] Côté-Laurin, M.-C. (Merinov) (2016). *Manuel Pour La Récolte Commerciale Des Macroalgues Au Québec*.; Québec.
- [19] Kornprobst, J.-M. (2005). *Substances Naturelles d'origine Marine : Chimiodiversité, Pharmacodiversité, Biotechnologie*; Édition tec & Doc, Ed.; Lavoisier: Paris.
- [20] Bleakley, S. & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* 6 (5), 33.
- [21] McHugh, D. J. (2003). *A Guide to the Seaweeds Industry*; Paper 441.
- [22] Tamigneaux, É. & Johnson, L. E. (2016). Les Macroalgues Du Saint-Laurent : Une Composante Essentielle d'un Écosystème Marin Unique et Une Ressource Naturelle Précieuse Dans Un Contexte de Changement Global. *Le Nat. Can.* 140 (2), 62–73.
- [23] Tamigneaux, É. (2014). Potentiel Des Grandes Algues Marines; 34.
- [24] Marinho-Soriano, E. Fonseca, P. C. Carneiro, M. A. A. & Moreira, W. S. C. (2006). Seasonal Variation in the Chemical Composition of Two Tropical Seaweeds. *Bioresour. Technol.* 97 (18), 2402–2406.
- [25] Kim, K. (2012). Seasonal Variation of Seaweed Components and Novel Biological Function of Fucoïdan Extracted From Brown Algae in Quebec, Université Laval, Québec.
- [26] Fiset, C. Liefer, J. Irwin, A. J. & Finkel, Z. V. (2017). Methodological Biases in Estimates of Macroalgal Macromolecular Composition. *Limnol. Oceanogr. Methods* 15 (7), 618–630.
- [27] Azmir, J. Zaidul, I. S. M. Rahman, M. M. Sharif, K. M. Mohamed, A. Sahena, F. Jahurul, M. H. A. Ghafoor, K. Norulaini, N. A. N. & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *J. Food Eng.* 117 (4), 426–436.
- [28] CEVA (2015). *Saccharina Latissima - Fiche Nutritionnelle*.

- [29] CEVA (2015). *Fucus Serratus, Vesiculosus - Fiche Nutritionnelle*.
- [30] Hopkins, W. G. & Évrard, C.-M. (2003). *Physiologie Végétale*; De Boeck.
- [31] Paul-Émilie Pilet (1961). *Les Phytohormones de Croissance : Methodes, Chimie, Biochimie, Physiologie, Applications Pratiques*, Massons.; Paris.
- [32] Reece. Urry. Cain. Wasserman. Minorsky. & Jackson (2012). *Biologie*, 4th ed.; ERPI, Ed.
- [33] Taiz, L. & E. Zeiger (2010). *Plant Physiology*, 5th ed.; Sinauer Associates.
- [34] Cao, D. Lutz, A. Hill, C. B. Callahan, D. L. & Roessner, U. (2017). A Quantitative Profiling Method of Phytohormones and Other Metabolites Applied to Barley Roots Subjected to Salinity Stress. *Front. Plant Sci.* 7 (2017), 1–19.
- [35] Huang, Z. Wang, Z. Shi, B. Wei, D. Chen, J. Wang, S. & Gao, B. (2015). Simultaneous Determination of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, Methyl Salicylate, and Methyl Jasmonate from *Ulmus Pumila* Leaves by GC-MS. *Int. J. Anal. Chem.* 2015, 1–7.
- [36] Pan, X. & Wang, X. (2009). Profiling of Plant Hormones by Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B* 877 (26), 2806–2813.
- [37] Porfírio, S. Gomes da Silva, M. D. R. Peixe, A. Cabrita, M. J. & Azadi, P. (2016). Current Analytical Methods for Plant Auxin Quantification – A Review. *Anal. Chim. Acta* 902, 8–21.
- [38] Olchemim Olchemim.cz; products. [En ligne]. Disponible à : <http://www.olchemim.cz/Products.aspx?idc=1&idp=1>. [Consulté le Jan 22, 2018].
- [39] Stirk, W. A. Novák, O. Strnad, M. & Van Staden, J. (2003). Cytokinins in Macroalgae. *Plant Growth Regul.* 41 (1), 13–24.
- [40] Ge, L. Peh, C. Y. C. Yong, J. W. H. Tan, S. N. Hua, L. & Ong, E. S. (2007). Analyses of Gibberellins by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Combined with Solid-Phase Extraction. *J. Chromatogr. A* 1159 (1–2), 242–249.
- [41] Jeffrey N. Harborne (1995). Book Review - Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. *Phytochemis* 39 (2), 479.
- [42] Ahuja, I. Kissen, R. & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in Defense against Pathogens. *Trends Plant Sci.* 17 (2), 73–90.
- [43] Hassan, S. & Mathesius, U. (2012). The Role of Flavonoids in Root-Rhizosphere Signalling: Opportunities and Challenges for Improving Plant-Microbe Interactions. *J. Exp. Bot.* 63 (9), 3429–3444.
- [44] Tsuchiya, Y. & McCourt, P. (2012). Strigolactones as Small Molecule Communicators. *Mol. Biosyst.* 8 (2), 464–469.
- [45] Stirk, W. A. Novák, O. Strnad, M. & Van Staden, J. (2003). Cytokinins in

Macroalgae. *Plant Growth Regul.* 41 (1), 13–24.

- [46] Wang, X. Zhao, P. Liu, X. Chen, J. Xu, J. Chen, H. & Yan, X. (2014). Quantitative Profiling Method for Phytohormones and Betaines in Algae by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 28 (2), 275–280.
- [47] Guo, J. M. Xin, Y. Y. & Yin, X. B. (2010). Selective Differentiation of Indoleacetic Acid and Indolebutyric Acid Using Colorimetric Recognition after Ehrlich Reaction. *J. Agric. Food Chem.* 58 (11), 6556–6561.
- [48] Liu, S. Chen, W. Qu, L. Gai, Y. & Jiang, X. (2013). Simultaneous Determination of 24 or More Acidic and Alkaline Phytohormones in Femtomole Quantities of Plant Tissues by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (4), 1257–1266.
- [49] Cao, Z. Y. Sun, L. H. Mou, R. X. Zhang, L. P. Lin, X. Y. Zhu, Z. W. & Chen, M. X. (2016). Profiling of Phytohormones and Their Major Metabolites in Rice Using Binary Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1451, 67–74.
- [50] Górká, B. & Wieczorek, P. P. (2017). Simultaneous Determination of Nine Phytohormones in Seaweed and Algae Extracts by HPLC-PDA. *J. Chromatogr. B* 1057, 32–39.
- [51] Betancourt, A. O. (2008). Analyse , Extraction Et Récupération De Poly-3-Hydroxybutyrate Présent Dans La Biomasse, Université du Québec à Montréal, Montréal.
- [52] Kaufmann, B. & Christen, P. (2002). Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. *Phytochem. Anal.* 13 (2), 105–113.
- [53] Wang, L. & Weller, C. L. (2006). Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17 (6), 300–312.
- [54] Mulbry, W. Kondrad, S. Buyer, J. & Luthria, D. L. (2009). Optimization of an Oil Extraction Process for Algae from the Treatment of Manure Effluent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (9), 909–915.
- [55] Wang, S. Chen, L. Fan, C. Q. & Wang, P. (2016). Determination of Abscisic Acid, Gibberellic Acid, Indole-3-Acetic Acid, and Zeatin Riboside in Masson Pine (*Pinus Massoniana* L.) by Accelerated Solvent Extraction and High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* 49 (13), 1986–1996.
- [56] Du, F. Ruan, G. & Liu, H. (2012). Analytical Methods for Tracing Plant Hormones. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (1), 55–74.

- [57] Cui, K. Lin, Y. Zhou, X. Li, S. Liu, H. Zeng, F. Zhu, F. Ouyang, G. & Zeng, Z. (2015). Comparison of Sample Pretreatment Methods for the Determination of Multiple Phytohormones in Plant Samples by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Microchem. J.* 121, 25–31.
- [58] Agilent (2017). *SOLUTIONS FOR WORRY-FREE SAMPLE PREPARATION*.
- [59] Agilent Technologies (2012). *SAMPLE PREPARATION Your Essential Resource for Supplies*.
- [60] Agilent Technologies (2011). *Bond Elut Plexa SPE Method Guide*.
- [61] Porfírio, S. Gomes da Silva, M. D. R. Peixe, A. Cabrita, M. J. & Azadi, P. (2016). Current Analytical Methods for Plant Auxin Quantification – A Review. *Anal. Chim. Acta* 902, 8–21.
- [62] ThermoFisher Overview of ELISA. [En ligne]. Disponible à : <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>. [Consulté le Jan 19, 2018].
- [63] Yao, Q. Zhu, H. H. & Chen, J. Z. (2005). Growth Responses and Endogenous IAA and IPAs Changes of Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Seedlings Induced by Arbuscular Mycorrhizal Fungal Inoculation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 105 (1), 145–151.
- [64] Guo, J. M. Xin, Y. Y. & Yin, X. B. (2010). Selective Differentiation of Indoleacetic Acid and Indolebutyric Acid Using Colorimetric Recognition after Ehrlich Reaction. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6556–6561.
- [65] Skoog, D. A. West, D. M. Holler, J. H. & Crouch, S. R. (2015). *Chimie Analytique*, 3ème éd.; Bruxelles : De Boeck, Ed.
- [66] Huang, Z. Wang, Z. Shi, B. Wei, D. Chen, J. Wang, S. & Gao, B. (2015). Simultaneous Determination of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, Methyl Salicylate, and Methyl Jasmonate from *Ulmus Pumila* Leaves by GC-MS. *Int. J. Anal. Chem.* 2015, 1–7.
- [67] Perrine, F. M. Rolfe, B. G. Hynes, M. F. & Hocart, C. H. (2004). Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Indoleacetic Acid and Tryptophan Following Aqueous Chloroformate Derivatisation of Rhizobium Exudates. *Plant Physiol. Biochem.* 42 (9), 723–729.
- [68] Birkemeyer, C. Kolasa, A. & Kopka, J. (2003). Comprehensive Chemical Derivatization for Gas Chromatography–Mass Spectrometry-Based Multi-Targeted Profiling of the Major Phytohormones. *J. Chromatogr. A* 993 (1–2), 89–102.
- [69] Müller, A. Düchting, P. & Weiler, E. (2002). A Multiplex GC-MS/MS Technique for the Sensitive and Quantitative Single-Run Analysis of Acidic Phytohormones

- and Related Compounds, and Its Application to Arabidopsis Thaliana. *Planta* 216 (1), 44–56.
- [70] Solans, M. Vobis, G. Cassán, F. Luna, V. & Wall, L. G. (2011). Production of Phytohormones by Root-Associated Saprophytic Actinomycetes Isolated from the Actinorhizal Plant Ochetophila Trinervis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (9), 2195–2202.
- [71] Honda, A. Yamashita, K. Miyazaki, H. Shirai, M. Ikegami, T. Xu, G. Numazawa, M. Hara, T. & Matsuzaki, Y. (2008). Highly Sensitive Analysis of Sterol Profiles in Human Serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* 49 (9), 2063–2073.
- [72] Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry*; Springer International Publishing: Cham.
- [73] CFMS Impact électronique. [En ligne]. Disponible à: <https://masse-spec.fr/impact-electronique>. [Consulté le Jun 4, 2019].
- [74] Eliuk, S. & Makarov, A. (2015). Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 8 (1), 61–80.
- [75] Thermo Scientific™ Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer. [En ligne]. Disponible à: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGAAPFADBMAZQ>. [Consulté le Jun 3, 2019].
- [76] Gupta, V. Kumar, M. Brahmabhatt, H. Reddy, C. R. K. Seth, A. & Jha, B. (2011). Simultaneous Determination of Different Endogenous Plant Growth Regulators in Common Green Seaweeds Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Method. *Plant Physiol. Biochem.* 49 (11), 1259–1263.
- [77] Stirk, W. A. Arthur, G. D. Lourens, A. F. Novák, O. Strnad, M. & Staden, J. van (2004). Changes in Cytokinin and Auxin Concentrations in Seaweed Concentrates When Stored at an Elevated Temperature. *J. Appl. Phycol.* 16 (1), 31–39.
- [78] Wally, O. S. D. Critchley, A. T. Hiltz, D. Craigie, J. S. Han, X. Zaharia, L. I. Abrams, S. R. & Prithiviraj, B. (2013). Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in Arabidopsis Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga Ascophyllum Nodosum. *J. Plant Growth Regul.* 32 (2), 324–339.
- [79] MarketsandMarkets Commercial Seaweeds Market by Type (Red Seaweeds, Brown Seaweeds, Green Seaweeds), Method of Harvesting (Aquaculture, Wild Harvesting), Form (Liquid, Powder, Flakes), Application (Food, Feed, Agriculture), and Region - Global Forecast to 2023. [En ligne]. Disponible à: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/commercial-seaweed-market-152763701.html>. [Consulté le Nov 7, 2018].
- [80] Sridhar, S. & Rengasamy, R. (2010). Effect of Seaweed Liquid Fertilizer on the Growth, Biochemical Constituents and Yield of Tagetes Erecta, Under Field Trial. *J. Phytol.* 2 (6), 61–68.

- [81] Stirk, W. A. & Van Staden, J. (1997). Comparison of Cytokinin- and Auxin-like Activity in Some Commercially Used Seaweed Extracts. *J. Appl. Phycol.* 8 (6), 503–508.
- [82] Schmelz, E. A. Engelberth, J. Alborn, H. T. O'Donnell, P. Sammons, M. Toshima, H. & Tumlinson, J. H. (2003). Simultaneous Analysis of Phytohormones, Phytotoxins, and Volatile Organic Compounds in Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (18), 10552–10557.
- [83] Yee Tam, Y. Epstein, E. & Normanly, J. (2000). Characterization of Auxin Conjugates in Arabidopsis. Low Steady-State Levels of Indole-3-Acetyl-Aspartate, Indole-3-Acetyl-Glutamate, and Indole-3-Acetyl-Glucose. *Plant Physiol.* 123, 6.
- [84] Basu, S. Sun, H. Brian, L. Quatrano, R. L. & Muday, G. K. (2002). Early Embryo Development in *Fucus Distichus* Is Auxin Sensitive. *Plant Physiol.* 130 (1), 292–302.
- [85] Lopes, G. Sousa, C. Bernardo, J. Andrade, P. B. Valentão, P. Ferreres, F. & Mouga, T. (2011). Sterol Profiles in 18 Macroalgae of the Portuguese Coast. *J. Phycol.* 47 (5), 1210–1218.
- [86] Adegoke, O. A. (2011). Analytical, Biochemical and Synthetic Applications of Para-Dimethylaminobenzaldehyde. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 11 (2), 17–29.
- [87] Rind, F. M. A. Khuhawar, M. Y. & Rajper, A. D. (2001). HPLC Determination of Phenylpropanolamine in Pharmaceutical Preparations Using 4-Dimethylaminobenzaldehyde as a Derivatizing Reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2), 331–336.
- [88] Lin, L. Zhang, J. Wang, P. Wang, Y. & Chen, J. (1998). Thin-Layer Chromatography of Mycotoxins and Comparison with Other Chromatographic Methods. *J. Chromatogr. A* 815 (1), 3–20.
- [89] Rodén, L. Yu, H. Jin, J. Ekborg, G. Estock, A. Krishna, N. R. & Livant, P. (1997). Analysis of the Morgan–Elson Chromogens by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 254 (2), 240–248.
- [90] Jan, M. R. Shah, J. Muhammad, M. & Ara, B. (2018). Flow Injection Spectrophotometric Determination of Glyphosate Herbicide in Wheat Grains via Condensation Reaction with P-Dimethylaminobenzaldehyde. *South African J. Chem.* 71, 39–45.
- [91] Adegoke, O. A. Adegbolagun, O. M. Aiyenale, E. O. & Thomas, O. E. (2018). New Spectrophotometric Method for the Determination of Gabapentin in Bulk and Dosage Forms Using p -Dimethylaminobenzaldehyde. *J. Taibah Univ. Sci.* 12 (6), 754–764.
- [92] Adegoke, O. A. & Quadri, M. O. (2016). Novel Spectrophotometric Determinations of Some Cephalosporins Following Azo Dye Formation with P-

Dimethylaminobenzaldehyde. *Arab. J. Chem.* 9, S1272–S1282.

- [93] O’Neal, C. L. Crouch, D. J. & Fatah, A. A. (2000). Validation of Twelve Chemical Spot Tests for the Detection of Drugs of Abuse. *Forensic Sci. Int.* 109 (3), 189–201.
- [94] Loginova, L. P. & Konovalova, O. Y. (2008). Test Films for Test-Determinations on the Base of Reagents, Immobilized in Gelatinous Gel. *Talanta* 77 (2), 915–923.
- [95] Sheikhshoaie, I. Belaj, F. & Fabian, W. M. F. (2006). 1-(4-Dimethylaminobenzyl)-2-(4-Dimethylaminophenyl)-Benzimidazole: Synthesis, X-Ray Crystallography and Density Functional Theory Calculations. *J. Mol. Struct.* 794 (1–3), 244–250.
- [96] Cunha, A. C. Figueiredo, J. M. Tributino, J. L. M. Miranda, A. L. P. Castro, H. C. Zingali, R. B. Fraga, C. A. M. de Souza, M. C. B. V. Ferreira, V. F. & Barreiro, E. J. (2003). Antiplatelet Properties of Novel N-Substituted-Phenyl-1,2,3-Triazole-4-Acylhydrazone Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 11 (9), 2051–2059.
- [97] Ha, S. T. Ong, L. K. Ong, S. T. Yeap, G. Y. Wong, J. P. W. Koh, T. M. & Lin, H. C. (2009). Synthesis and Mesomorphic Properties of New Schiff Base Esters with Different Alkyl Chains. *Chinese Chem. Lett.* 20 (7), 767–770.
- [98] Tian, Y.-P. Duan, C.-Y. Lu, Z.-L. You, X.-Z. Fun, H.-K. & Kandasamy, S. (1996). Crystal Structure and Spectroscopic Studies on Metal Complexes Containing NS Donor Ligands Derived from S-Benzyldithiocarbamate and p-Dimethylaminobenzaldehyde. *Polyhedron* 15 (13), 2263–2271.
- [99] Schmelz, E. A. Engelberth, J. Tumlinson, J. H. Block, A. & Alborn, H. T. (2004). The Use of Vapor Phase Extraction in Metabolic Profiling of Phytohormones and Other Metabolites. *Plant J.* 39 (5), 790–808.
- [100] Müller, B. & Vahrenkamp, H. (2000). A Zinc–Alimine Complex. *Inorganica Chim. Acta* 300–302, 181–185.
- [101] Lamb, A. C. Federico-Perez, R. A. & Xue, Z.-L. (2015). Product in Indole Detection by Ehrlich’s Reagent. *Anal. Biochem.* 484, 21–23.
- [102] KOHNO, Y. KAMIYA, J. OKUBO, T. & MATSUSHIMA, R. (2009). Color Sensors for Indole Vapors Based on Ehrlich-Type Reactions. *Anal. Sci.* 25 (1), 129–132.
- [103] Wang, F. Gu, X. Zheng, C. Dong, F. Zhang, L. Cai, Y. You, Z. You, J. Du, S. & Zhang, Z. (2017). Ehrlich Reaction Evoked Multiple Spectral Resonances and Gold Nanoparticle Hotspots for Raman Detection of Plant Hormone. *Anal. Chem.* 89 (17), 8836–8843.
- [104] Miller, J. M. & Wright, J. W. (1982). Spot Indole Test: Evaluation of Four Reagents. *J. Clin. Microbiol.* 15 (4), 589–592.
- [105] Jin, Q. Shan, L. Yue, J. & Wang, X. (2008). Spectrophotometric Determination of Total Serotonin Derivatives in the Safflower Seeds with Ehrlich’s Reagent and the

- Underlying Color Reaction Mechanism. *Food Chem.* 108 (2), 779–783.
- [106] Federico-Perez, R. A. & Xue, Z.-L. (2018). Optical Probe for the Analysis of Trace Indole in Shrimp. *Anal. Biochem.* 557, 104–110.
- [107] Schummer, C. Delhomme, O. Appenzeller, B. Wennig, R. & Millet, M. (2009). Comparison of MTBSTFA and BSTFA in Derivatization Reactions of Polar Compounds Prior to GC/MS Analysis. *Talanta* 77 (4), 1473–1482.
- [108] Halket, J. M. & Zaikin, V. G. (2004). Derivatization in Mass Spectrometry – 3. Alkylation (Arylation). *Eur. J. Mass Spectrom* 10, 1–19.
- [109] Sigma-Aldrich (1997). Bulletin 909A Guide to Derivatization Reagents for GC. 1–12.
- [110] Presser, A. & Hübner, A. (2004). Trimethylsilyldiazomethane? A Mild and Efficient Reagent for the Methylation of Carboxylic Acids and Alcohols in Natural Products. *Monatshefte für Chemie/Chemical Mon.* 135 (8), 1015–1022.
- [111] Kühnel, E. Laffan, D. D. P. Lloyd-Jones, G. C. Martínez del Campo, T. Shepperson, I. R. & Slaughter, J. L. (2007). Mechanism of Methyl Esterification of Carboxylic Acids by Trimethylsilyldiazomethane. *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (37), 7075–7078.
- [112] Ivanov Dobrev, P. & Kamínek, M. (2002). Fast and Efficient Separation of Cytokinins from Auxin and Abscisic Acid and Their Purification Using Mixed-Mode Solid-Phase Extraction. *J. Chromatogr. A* 950 (1–2), 21–29.
- [113] Engelberth, J. Schmelz, E. A. Alborn, H. T. Cardoza, Y. J. Huang, J. & Tumlinson, J. H. (2003). Simultaneous Quantification of Jasmonic Acid and Salicylic Acid in Plants by Vapor-Phase Extraction and Gas Chromatography-Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* 312 (2), 242–250.

Annexe 1 : Fiche nutritionnelle de la *Saccharina latissima* [28]

Saccharina latissima		Fiche Nutritionnelle				
Teneurs pour 100 g d'algue déshydratée (produit brut)		Version du 14/03/2016				
Paramètres	Unité	Teneur Moyenne	Min	Max	Nb données	
Energie	kJ	851				
Energie	kcal	204				
Eau	g	8,6	3,5	14,6	3	
Minéraux	g	27,2	11,1	47,6	21	
Protéines (Nx6.25)	g	10,3	4,3	23,5	28	
Glucides (par différence)	g	23,6				
Fibres Alimentaires	g	29,3	27,6	30,9	2	
Lipides	g	1,1	0,5	3,0	5	
AG saturés	g	0,25	0,25	0,25	1	
AG monoinsaturés	g	0,18	0,18	0,18	1	
AG polyinsaturés	g	0,30	0,30	0,30	1	
Polyphénols (eq phloroglucinol)	g	0,3	0,1	0,6	19	
Sodium	mg	3 633	2 558	5 117	3	
Magnésium	mg	834	384	2 549	15	
Phosphore	mg	208	9	731	11	
Potassium	mg	6 249	3 764	9 411	3	
Calcium	mg	801	384	2 549	12	
Manganèse	mg	1,0	0,1	4,1	22	
Fer	mg	23,1	1,5	116,9	23	
Cuivre	mg	0,2	0,0	0,5	22	
Zinc	mg	2,3	0,7	3,9	22	
Iode*	mg	340,7	3,6	639,6	37	
Sélénium	µg	520,8	520,8	520,8	1	
Chrome	µg	239,6	50,0	500,0	9	
Molybdène	µg	39,7	1,0	90,0	9	
Vitamine A (eq rétinol)	mg	0,10	0,05	0,15	2	
Beta-carotène	mg	nd				
Vitamine D	µg	1,3	1,3	1,3	1	
Vitamine E (eq tocophérols)	mg	0,6	0,5	0,6	2	
Vitamine K ou phytoménadione	µg	nd				
Vitamine C	mg	11,4	0,0	22,8	2	
Vitamine B1 ou Thiamine	mg	0,4	0,4	0,4	1	
Vitamine B2 ou Riboflavine	mg	0,3	0,3	0,3	1	
Vitamine B3 ou PP ou Niacine	mg	nd				
Vitamine B5 ou acide panthothénique	mg	nd				
Vitamine B6 ou Pyridoxine	mg	nd				
Vitamine B8 ou H ou Biotine	µg	nd				
Vitamine B9 ou Folates	µg	nd				
Vitamine B12 ou Cobalamines	µg	nd				

*Attention : Les algues utilisées en alimentaire doivent avoir une teneur en iode maximale de 2000 mg/kg sec (Saisine AFSSA n° 2007-SA-0007)

Annexe 2 : Fiche nutritionnelle de la Fucus serratus, vesiculosus [29]

Fucus serratus, vesiculosus					
Fiche Nutritionnelle					
					
Teneurs pour 100 g d'algue déshydratée (produit brut) Version du 14/03/2016					
Paramètres	Unité	Teneur Moyenne	Min	Max	Nb données
Energie	kJ	809			
Energie	kcal	194			
Eau	g	11,6	5,5	15,2	4
Minéraux	g	19,4	11,5	26,6	12
Protéines (Nx6.25)	g	7,4	1,2	15,6	13
Glucides (par différence)	g	15,7			
Fibres Alimentaires	g	44,6	37,3	52,3	3
Lipides	g	1,3	0,3	5,0	23
AG saturés	g	0,35	0,35	0,35	1
AG monoinsaturés	g	0,20	0,20	0,20	1
AG polyinsaturés	g	0,30	0,30	0,30	1
Polyphénols (eq phloroglucinol)	g	5,6	0,9	11,3	10
Sodium	mg	4 023	3 183	4 863	2
Magnésium	mg	885	203	1 901	14
Phosphore	mg	nd			
Potassium	mg	3 272	2 741	3 802	2
Calcium	mg	1 167	831	1 503	2
Manganèse	mg	8,3	2,5	13,7	10
Fer	mg	14,7	3,7	46,0	21
Cuivre	mg	0,4	0,1	1,3	25
Zinc	mg	8,2	0,7	29,2	25
Iode	mg	40,0	21,2	88,4	46
Sélénium	µg	88,4	88,4	88,4	1
Chrome	µg	521,7	30,0	1 150,0	2
Molybdène	µg	47,2	34,0	65,0	3
Vitamine A (eq rétinol)	mg	nd			
Beta-carotène	mg	12	12	12	1
Vitamine D	µg	nd			
Vitamine E (eq tocophérols)	mg	12	8	18	68
Vitamine K ou phytoménadione	µg	nd			
Vitamine C	mg	nd			
Vitamine B1 ou Thiamine	mg	nd			
Vitamine B2 ou Riboflavine	mg	nd			
Vitamine B3 ou PP ou Niacine	mg	1,7	1,2	1,9	3
Vitamine B5 ou acide panthothénique	mg	nd			
Vitamine B6 ou Pyridoxine	mg	nd			
Vitamine B8 ou H ou Biotine	µg	47,3	30,9	61,0	12
Vitamine B9 ou Folates	µg	nd			
Vitamine B12 ou Cobalamines	µg	nd			

Elaboré par le CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues), Fleublan, France - www.ceva.fr

Annexe 3: Supporting information

Supporting information for

Study of the Ehrlich colorimetric method for the quantification of indolebutyric acid:
Application to the *Saccharina latissima* seaweed

Véronique Langlois¹, Jonathan Gagnon^{1*}, Maude Sirois²

3. Department of biology, chemistry and geography, Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada
4. Merinov, 96, montée de Sandy Beach, Gaspé, Québec, G4X 2V6, Canada

*E-mail: Jonathan_Gagnon@uqar.ca

Contents

Figure S1-S5

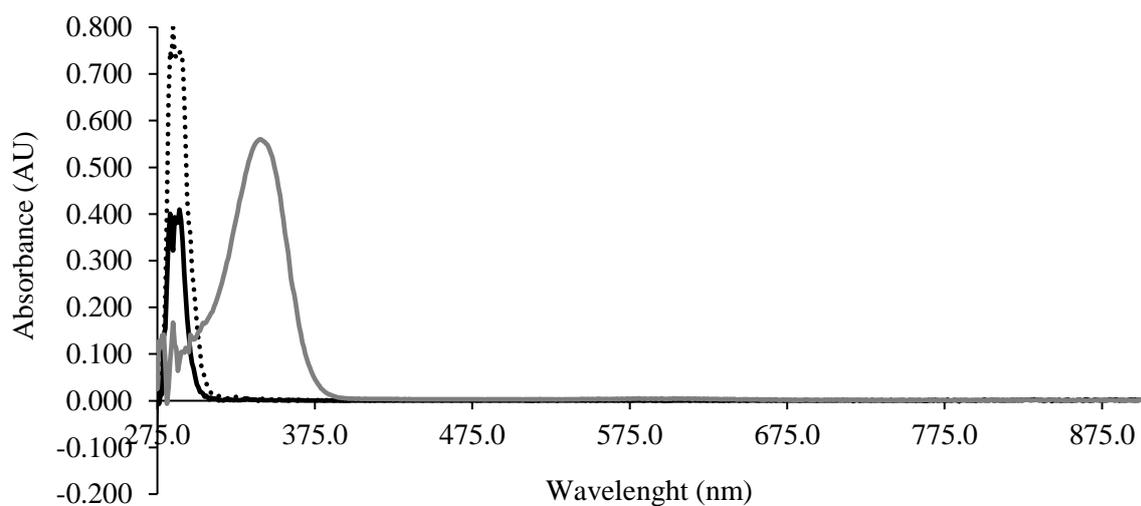


Figure S1. UV-visible spectra of IAA 0.078 mM (black line), IBA 0.125 mM (black dotted line) and PDAB 0.5 mM (grey line) in methanol

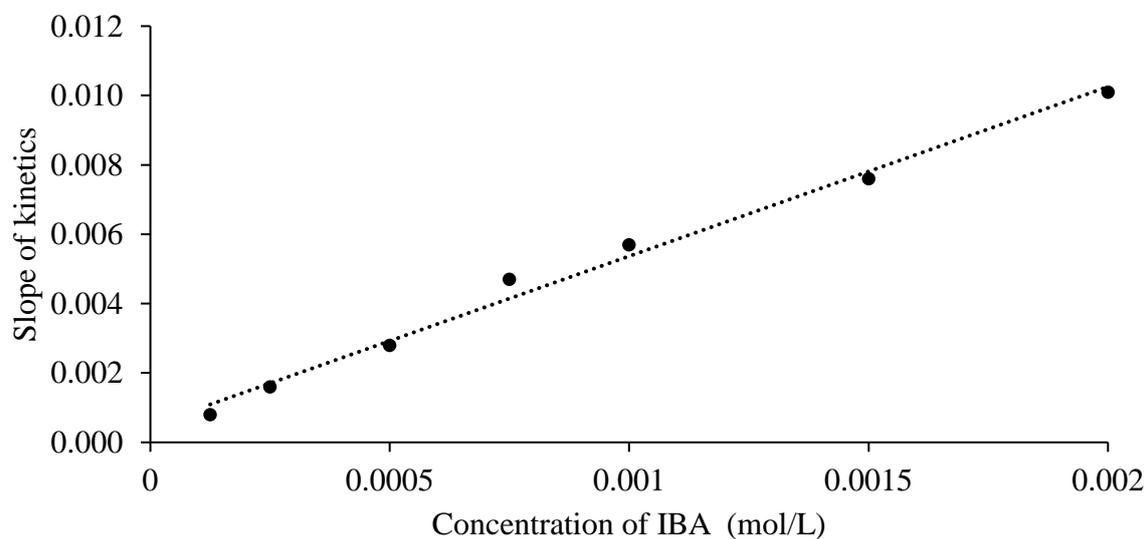


Figure S2. Slope of the kinetics at rt on a period of 18 h in function of the concentration of IBA ($y = 4.8854x + 0.0005$, $R^2 = 0.9911$)

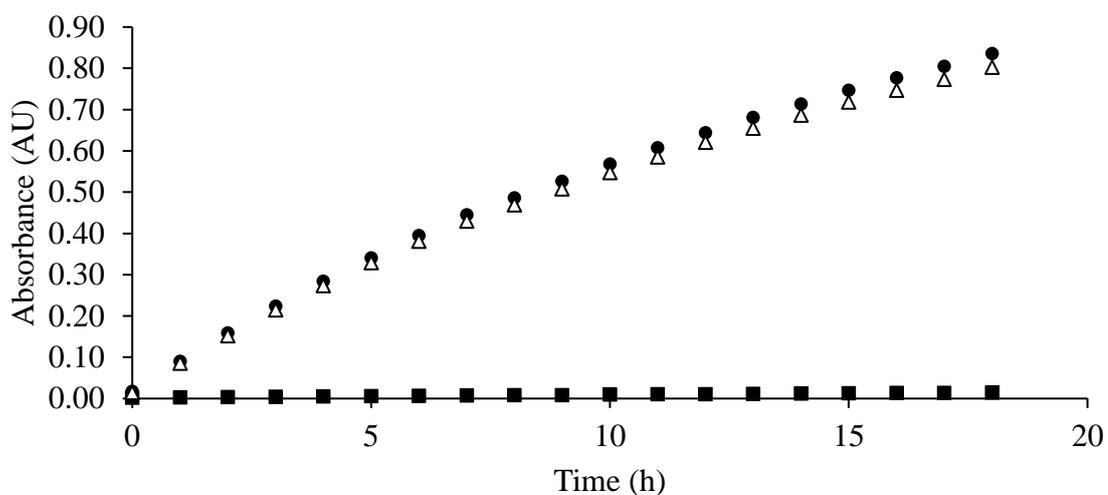


Figure S3. Kinetics of the reaction of IAA 5 mM (square), IBA 5 mM (circle), and mixture of the two auxins (triangle) with 0.10 M PDAB at rt followed at 583 nm

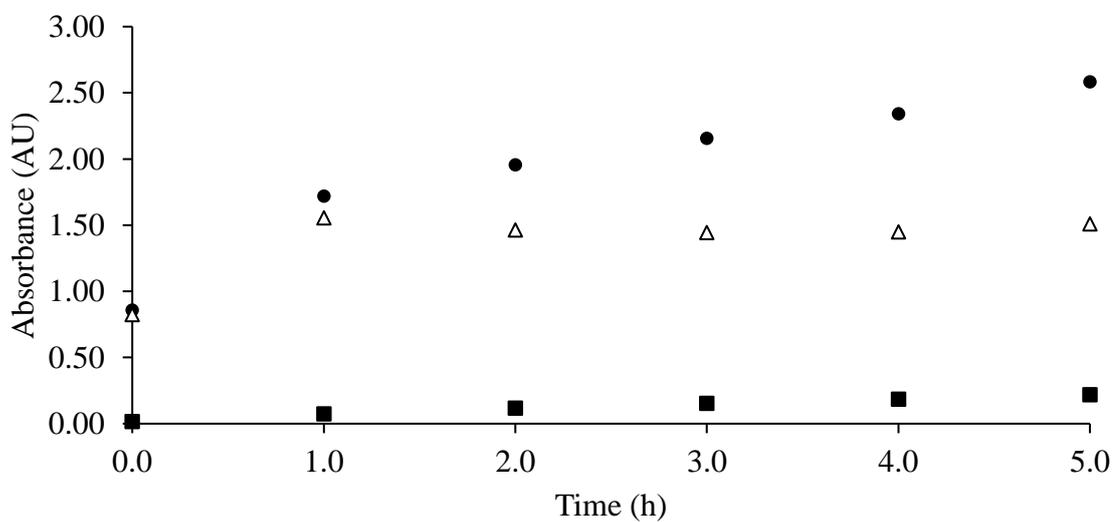


Figure S4. Kinetics of the reaction of IAA 5 mM (square), IBA 5 mM (circle), and mixture of the two auxins (triangle) with 0.1M PDAB at 70°C followed at 583 nm

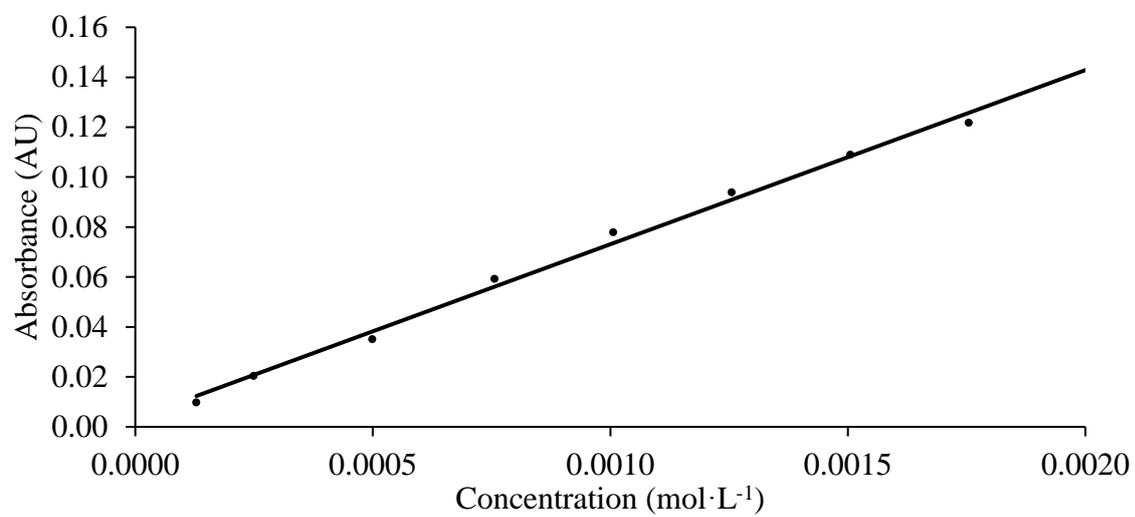


Figure S5. Example of a calibration curve for the quantification of IBA at rt

$$(y=69.735x+0.0034, R^2 = 0.9958)$$