



HAL
open science

Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines

Virginie Pasquet

► **To cite this version:**

Virginie Pasquet. Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2011. Français. NNT : 2011LAROS321 . tel-00665228

HAL Id: tel-00665228

<https://theses.hal.science/tel-00665228>

Submitted on 1 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE
École Doctorale Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Laboratoire LIENSs

THÈSE

présentée par :

Virginie PASQUET

Soutenue le 14 janvier 2011
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biochimie

**Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses
issues de microalgues marines**

JURY :

Jean- Michel KORNPORST
Eric DESLANDES
Claire ELFAKIR
Jean-Paul CADORET
Valérie THIERY
Jean-Marie PIOT
Laurent PICOT

Professeur, Université de Nantes, Rapporteur
Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Rapporteur
Professeur, Université d'Orléans, Examinatrice
Directeur de Recherche, IFREMER, Nantes, Examineur
Professeur, Université de La Rochelle, Directrice de thèse
Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse
Maître de conférences, Université de La Rochelle

*Aux nombreuses personnes qui ont participé, chacune à
leur manière, à la réalisation de ce mémoire.*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier « La Ligue contre le cancer » pour le financement de cette thèse et la confiance qu'elle m'a accordée.

Je remercie le Professeur Sylvain Lamare, directeur du Laboratoire LIENSs, pour m'avoir accueillie pendant la durée de cette thèse.

Je tenais à remercier tout particulièrement les membres du Jury.

Je remercie Jean-Michel Kornprobst Professeur à l'Université de Nantes et le Professeur Eric Deslandes de l'Université de Bretagne Occidentale qui me font l'honneur d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs.

Ensuite, je tiens à remercier le Professeur Claire Elfakir de l'Université d'Orléans et Jean-Paul Cadoret, Directeur de recherche à l'IFREMER de Nantes qui me font l'honneur d'accepter d'examiner cette thèse.

Je remercie également mes deux directeurs de thèse, le Professeur Valérie Thiéry ainsi que le Professeur Jean-Marie Piot, pour leur encadrement, leur disponibilité et pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Enfin, je remercie tout particulièrement le Docteur Laurent Picot, Maître de conférences à l'Université de La Rochelle, pour m'avoir encadrée. Merci pour la confiance qu'il a su m'accorder, sa disponibilité et pour tout ce qu'il m'a appris.

Le travail présenté dans ce mémoire a été possible grâce à la collaboration entre le laboratoire PBA de l'IFREMER et LIENSs. Je remercie tout particulièrement Jean-Paul Cadoret, Raymond Kaas, Jean-Baptiste Bérard et Benoît Serive de l'IFREMER avec qui j'ai travaillé et qui ont toujours su répondre à mes différentes questions.

Un grand merci aux personnes qui m'ont aidée dans la réalisation du travail expérimental. Merci à Valérie Thiéry, Isabelle Lanneluc, Jean-René Chérouvrier et Monique Bordes.

Je remercie tout particulièrement les étudiants qui ont travaillé avec moi pour leur bonne humeur et le travail accompli. Merci à Perrine, Firas, Amandine, Lucie et Saïd. Je remercie également Mathieu qui m'a épaulé sur de nombreux aspects. Je remercie également l'ensemble des collègues du laboratoire qui m'ont accompagnée durant ces trois années et qui ont rendu le travail au laboratoire agréable. Je remercie plus particulièrement Valérie S, Isabelle G, Eric, Fatima, Michel, Nicolas B, Cyrille, Sandrine, Phillippe, Pierre, Matthieu, Romain, Kim, Christine, Laëtitia, Patricia, Vivianne et Betty.

Merci à Zsu, Hélène, petit R, Claire, Guillaume, Micka, Andréa L, Beby, petit Nico pour toutes les bonnes soirées passées pendant ces trois ans. Merci également à mes amis qui ont été présents en filigrane au cours de la réalisation de ce projet : Emile B, Emile M, Karine, Angèle, Peggy, Gigi, Valérie, Myriam, Benjamin, Annabelle, Annie et Laurence. Je remercie tout particulièrement mes amis de l'ADocs et de SurdoRei pour les moments de détente apportés pendant la thèse.

Je tenais à remercier les relecteurs de ce mémoire : Laurent, Valérie T, Hervé, Nico J et Delphine. Egalement un grand merci aux personnes qui ne sont pas du métier et qui ont relu ma thèse : Marise, Annie et « Chocaillo ».

Je remercie à nouveau Hervé et Nico J, pour leur présence et leur soutien lors de la rédaction de ce mémoire. Je pense à mon collègue de bureau Manu. Nous avons rédigé en même temps. Merci pour ta bonne humeur au quotidien et pour tous les bons moments.

Merci Andréa pour toutes les bonnes soirées et tout le reste.

A Delphine, merci pour ton soutien inconditionnel pendant ces trois ans. Mais aussi pour tous les conseils et pour ton amitié.

Je remercie bien sûr mes parents qui ont toujours été présents durant toutes mes études supérieures et sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Je remercie également mes frères et l'ensemble de ma famille.

Pour terminer, je remercie Sébastien. Merci d'avoir compris l'importance de ce projet. Merci pour tout.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyRibonucléique

APC : AlloPhycoCyanine

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (ionisation chimique à pression atmosphérique)

Aq : Aqueux

ARA-A : Adenine-arabinoside

ARA-C : Cytosine-arabinoside, Cytarabine, Cytosar-U®

ARN : Acide RiboNucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine TriPhosphate

CAD : Caspase Activated DNase

CCMP : Culture Collection of Marine Phytoplankton (Bigelow, U.S.A)

Cdk : Cyclin dependant Kinase

Chl. : Chlorophylle

CI₅₀ : Concentration Inhibant 50% de la croissance cellulaire

CKI : CdK Inhibitor

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CR : Centre Réactionnel

CRMPO : Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest

DCM : DiChloroMéthane

DFF : DNA Fragmentation Factor

DISC : Death Inducing Signaling Complex

DMEM : Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium

DMSO : DiMéthyl SulfOxide

ESI : Electrospray

EtOH : Ethanol

FDA : Food and Drug Administration
FLIP : FADD-like ICE inhibitory proteins
GTP : Guanosine TriPhosphate
HAT : Histone AcétylTransférase
HDAC : Histone DéACétylase
HEPES : acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique
IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
IFN : InterFéroN
IL : InterLeukine
LIENSs : LIittoral ENvironnement et Sociétés
MAE : Microwaves Assisted Extraction
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
MTT : bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium
NBRC : National Institute of Technology, Biological Resource Center (Japon)
NCI : National Cancer Institute
NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
NK : Natural Killer
NKT : Natural Killer T
PARP : Poly ADP Ribose Polymerase
PBA : Physiologie et Biotechnologie des Algues
PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)
PC : PhycoCyanine
PDA : Photodiode Detector Array (Décteur à barrettes de diodes)
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PDT : Photothérapie Dynamique des Tumeurs
PE : PhycoErythrine
PKC : Protéine Kinase C
PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor

PQ : PlastoQuinone

PS : PhotoSystème

Ps : Phosphatidylsérine

PVDF : Fluorure de polyvinylidène

ROS : Reactive Oxygen Species (Espèce Réactive de l'Oxygène)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TNF : Tumor Necrosis Factor

UAE : Ultrasound Assisted Extraction

UV : Ultra-Violet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VMAE : Vacuum Microwaves Assisted Extraction

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le cycle cellulaire.....	3
Figure 2 : Les six altérations physiologiques de la cellule conduisant à la formation de cellules cancéreuses.....	5
Figure 3 : Les différentes étapes de la progression tumorale, en association avec les altérations génétiques des cellules.....	7
Figure 4 : Ordre d'apparition des différentes altérations physiologiques de la cellule conduisant à la formation de cellules cancéreuses	8
Figure 5 : Régulation de l'apoptose. Voie intracellulaire et voie extracellulaire.....	10
Figure 6 : Représentation du principe de la PDT	15
Figure 7 : Les cibles des agents antitumoraux	17
Figure 8 : Structure chimique de la mitomycine C	19
Figure 9 : Structure chimique du mitoxantrone	20
Figure 10 : Structure chimique du fluorouracile	21
Figure 11 : Structure chimique de la colchicine 1	22
Figure 12 : Structure chimique du flavopiridol.....	23
Figure 13 : Structure chimique du bortezomibe.....	26
Figure 14 : Structure chimique de l'ABT-737	26
Figure 15 : Voies thérapeutiques de l'apoptose	28
Figure 16 : Structure chimique de la vincristine et du paclitaxel.....	29
Figure 17 : Structure chimique de la bléomycine A ₂	29
Figure 18 : Structure chimique de l'actinomycine D	30
Figure 19 : Structure chimique de la trabectedine et de la bryostatine-1	30
Figure 20 : Structure chimique de l'ixabepilone.....	30
Figure 21 : Structure chimique du temsirolimus.....	31
Figure 22 : Exemples de la diversité chimique du monde végétal terrestre ; formule chimique de la camptothécine, la vinblastine et de l'étoposide 5 (épipodophyllotoxine)	32
Figure 23 : Structure chimique du flavopiridol, de la β -lapachone, de l'homoharringtonine, et de la combrestatine A4.....	33
Figure 24 : Structure chimique de la romidepsine	34

Figure 25 : Structure chimique de l'halomon issu de l'algue rouge <i>Portiera hornemannii</i>	35
Figure 26 : Structure chimique de la céphalostatine 1 et du salinosporamide A	36
Figure 27 : Structure chimique de la céphalosporine C	36
Figure 28 : Structure chimique de l'ARA C	37
Figure 29 : Structure chimique du ziconotide (Prialt®) et photographie de <i>Conus magus</i>	37
Figure 30 : Structure chimique de la trabectedine et photographie de <i>Ecteinascidia turbinata</i>	40
Figure 31 : Structure chimique de E7974 et photographie de <i>Hemiasterella minor</i>	41
Figure 32 : Structure chimique du kahalalide F et photographie de <i>Elysia rufescens</i>	41
Figure 33 : Structure chimique de la dolastatine 10 et photographie de <i>Symploca sp.</i>	42
Figure 34 : Structure chimique de l'éribuline mésylate et photographie de <i>Halichondria okadai</i>	43
Figure 35: Structure chimique de la spisulosine et photographie de <i>Spisula polynyma</i>	43
Figure 36 : Structure chimique du Zalypsis® et photographie de <i>Joruna funebris</i>	44
Figure 37 : Structure chimique du NPI-2358 et photographie de <i>Aspergillus sp.</i> CNC- 139	44
Figure 38 : Structure chimique du KRN 7000 et photographie d' <i>Agelas clathrodes</i>	45
Figure 39 : Structure chimique de la squalamine	45
Figure 40 : Structure chimique du panobinostat	46
Figure 41 : Structure chimique du salinosporamide A et photographie de <i>salinospora tropica</i>	46
Figure 42 : Structure chimique de la Bryostatine 1 et photographie de <i>Bugula neritina</i>	47
Figure 43 : Structure chimique de la déhydrodidemnine B et photographie de <i>Aplidium albicans</i>	48
Figure 44 : Structure chimique du discodermolide	49
Figure 45 : Diagramme synthétique de la phylogénie des chloroplastes endosymbiotiques primaires basé sur le résultat de l'analyse des séquences génétiques.....	51
Figure 46 : Diagramme synthétique résumant l'origine des différents embranchements d'algues	52
Figure 47 : Représentation schématique d'un chloroplaste	58
Figure 48 : Principe général de la photosynthèse chez les rhodophytes	59

Figure 49 : Chaîne de transport d'électrons dans les membranes thylacoïdales eucaryotes.....	60
Figure 50 : Structure de la chlorophylle <i>a</i>	61
Figure 51 : Structure chimique du phéophorbide <i>a</i>	62
Figure 52 : Structure chimique de caroténoïdes : fucoxanthine, β,β -carotène.....	62
Figure 53 : Cycle des xanthophylles chez les Chlorobiontes.....	63
Figure 54 : Cycle des xanthophylles chez les ochrophytes.....	64
Figure 55 : Structure de la phycocyanobiline.....	64
Figure 56 : Disposition des phycobilines dans un phycobilisome.....	65
Figure 57 : Structure chimique du perforenol B et de la chondriamide A.....	67
Figure 58 : Structure chimique du dehydrothysiferol et de la lophocladine B.....	68
Figure 59 : Structure chimique du jamaicamide A et de la wewakpeptine A.....	70
Figure 60 : Structure chimique de l'amphidinolide A, du caribenolide I.....	71
Figure 61 : Structure chimique de l'acide domoïque.....	71
Figure 62 : Observation microscopique de <i>Nannochloropsis salina</i> et <i>Nannochloropsis oculata</i>	81
Figure 63 : Observation microscopique de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	81
Figure 64 : Observation microscopique de <i>Polypodochrysis teissieri</i>	82
Figure 65 : Observation microscopique (x200) de la lignée MCF-7 en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.....	86
Figure 66 : Observation microscopique (x200) de la lignée MDA-MB-231 en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.....	87
Figure 67 : Observation microscopique (x200) de la lignée A549 en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.....	87
Figure 68 : Observation microscopique (x200) de la lignée LNCap en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.....	88
Figure 69 : Action de la succinate déshydrogénase sur le MTT. Coupure du cycle tétrazolium conduisant à la formation de cristaux de formazan.....	89
Figure 70 : Plan de dépôt des extraits et des cellules en plaque 96 puits pour l'évaluation du potentiel antiprolifératif des extraits microalgaux.....	91
Figure 71 : Démarche expérimentale pour la purification bioguidée des principes actifs de microalgues marines.....	93

Figure 72 : Chromatogramme de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> , à 435nm, en mode semi-préparatif. F ₁ , F ₂ , F ₃ et F ₄ représentant les différentes fractions réalisées pour cet extrait.....	102
Figure 73 : Chromatogramme de la fraction F ₁ de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> , à 435nm, en mode semi-préparatif. F _{1.1} , F _{1.2} , F _{1.3} et F _{1.4} représentant les différentes sous-fractions réalisées pour cet extrait.....	104
Figure 74 : CI ₅₀ en µg.ml ⁻¹ pour l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> , de sa fraction F ₁ et de sa sous-fraction F _{1.4} sur la lignée cellulaire MCF-7.....	106
Figure 75 : Chromatogramme de F _{1.4} de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> à 435 nm, en mode analytique. Pureté et spectre d'absorption pour la molécule.....	107
Figure 76 : Analyse du ratio bande III/II pour le lycopène.....	109
Figure 77 : Formule chimique de la violaxanthine	113
Figure 78 : Cinétiques de croissance continue sur cellules traitées par la sous-fraction F _{1.4} à différentes concentrations réalisées sur la lignée MCF-7	115
Figure 79 : Cinétiques de croissance discontinues sur cellules traitées par la Violaxanthine à différentes concentrations réalisées sur la lignée MCF-7	116
Figure 80 : Observation microscopique en fluorescence (×200) de cellules de lignée MCF-7 marquées par le marqueur d'ADN BOBO-1 (vert) et par l'Annexine-V-Alexa 568 (rouge) après 48h d'incubation en présence de 0 µg.ml ⁻¹ et de 8 µg.ml ⁻¹ de violaxanthine.....	118
Figure 81 : Structure chimique de différents caroténoïdes : β,β-carotène, lutéine, zéaxanthine, lycopène, astaxanthine, canthaxanthine	119
Figure 82 : Structure chimique de la fucoxanthine, de la néoxanthine et de la violaxanthine	121
Figure 83 : Mécanisme d'action proposé par Kim <i>et al</i> , pour l'induction de l'apoptose par la fucoxanthine sur la lignée HL-60.....	123
Figure 84 : Structure chimique de la diadinoxanthine	125
Figure 85 : Observation microscopique de <i>Cylindrotheca closterium</i>	130
Figure 86 : Chromatogramme de l'extrait acétonique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> , à 435nm, obtenu en mode analytique.....	139
Figure 87 : Chromatogramme de l'extrait acétonique de <i>Cylindrotheca closterium</i> , à 435nm, obtenu en mode analytique.....	142

Figure 88 : Chromatogramme à 435 nm de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> obtenu en mode semi-préparatif.....	147
Figure 89 : Représentation schématique de la répartition sur le chromatogrammes des pigments de microalgues marines, selon le gradient B, mode analytique à 435 nm. (Chromatogramme : extrait acétonique de <i>D. tertiolecta</i>)	149
Figure 90 : Schéma de l'extraction de pigments par VMAE	155
Figure 91 : Observations en microscopie électronique à balayage de <i>Cylindrotheca closterium</i> après lyophilisation, lyophilisation suivie d'une UAE, d'une macération à chaud, d'une macération à température ambiante, d'une MAE et d'une VMAE.	159
Figure 92 : Observations en microscopie électronique à balayage de <i>Dunaliella tertiolecta</i> après lyophilisation, lyophilisation suivie d'une macération, d'une UAE, d'une MAE et d'une VMAE	160
Figure 93 : Chromatogramme de l'extrait de <i>Cylindrotheca closterium</i> après macération à température ambiante, à 435 nm, en mode analytique	162
Figure 94 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Cylindrotheca closterium</i> en fonction du temps obtenus pour la macération à température ambiante (20°C) et la macération à chaud (56°C)	163
Figure 95 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Cylindrotheca closterium</i> obtenus pour l'UAE en fonction du temps, pour P= 12,2 W, et fonction de la puissance pour t= 5min	165
Figure 96 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Cylindrotheca closterium</i> obtenus, pour la MAE en fonction du temps pour P= 50 W et fonction de la puissance pour t= 5min	166
Figure 97 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Cylindrotheca closterium</i> obtenus pour la VMAE, en fonction du temps pour P= 50 W et fonction de la puissance pour t= 5min	167
Figure 98 : Comparaison entre les rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Cylindrotheca closterium</i> obtenus pour la macération à température ambiante et la macération à chaud pendant 10 min. Et pour la MAE et la VMAE pour P= 50 W et t=5min	169

Figure 99 : Présentation des meilleurs rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Cylindrotheca closterium</i> obtenus pour chacune des méthodes d'extraction pour les paramètres permettant d'obtenir les meilleurs rendements.....	170
Figure 100 : Chromatogramme de l'extrait de <i>Dunaliella tertiolecta</i> après macération à température ambiante, à 435 nm, en mode analytique	173
Figure 101 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Dunaliella tertiolecta</i> en fonction du temps obtenus pour la macération à température ambiante (20°C)	174
Figure 102 : Comparaison des rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Dunaliella tertiolecta</i> obtenus en MAE (50W, 5min), VMAE (50W, 5min), UAE (12,2W, 5min) et Macération (20°C, 5min).....	175

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Changements morphologiques et biochimiques chez la cellule durant l'apoptose.....	13
Tableau 2 : Molécules marines anticancéreuses identifiées et caractérisées entre 1998 et 2006.....	38
Tableau 3 : Les différents anticancéreux actuellement sur le marché ou en phase d'essai clinique.....	39
Tableau 4: Caractéristiques principales des différentes classes d'algues	54
Tableau 5 : Diversité des microalgues marines et dulçaquicoles.....	69
Tableau 6 : Genres microalgues utilisés en industrie, avec leurs applications	73
Tableau 7 : Principaux pigments caractéristiques des procaryotes photosynthétiques et des différentes classes ou divisions d'algues	80
Tableau 8 : Conditions de culture de <i>Nannochloropsis salina</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Dunaliella salina</i> et de <i>Polypodochrysis teissieri</i>	83
Tableau 9 : Concentration cellulaire utilisée pour évaluer le potentiel antiprolifératif des différents extraits, fractions et sous-fractions pour les lignées cellulaires MCF-7, LNCap, MDA-MB-231 et A549	90
Tableau 10 : Colonnes et Gradients de solvants utilisés en CLHP analytique, semi-préparative et préparative.....	94
Tableau 11 : Concentration cellulaire utilisée pour évaluer le potentiel cytostatique de molécules isolées pour les lignées cellulaires MCF-7 et A549	96
Tableau 12 : CI_{50} en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des différents extraits testés sur les lignées cellulaires cancéreuses utilisées. Avec, Aq : extrait aqueux, EtOH : extrait éthanolique, DCM : extrait dichlorométhanique.....	100
Tableau 13 : CI_{50} en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des différentes fractions de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> testées sur la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7. Avec Fn : fraction d'extrait.....	103
Tableau 14 : CI_{50} en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des différentes sous-fractions de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> testées sur MCF-7. Fn : fraction d'extrait.....	105
Tableau 15 : Conditions expérimentales et résultats obtenus pour la sous-fraction $F_{1,4}$ en spectrométrie de masse haute résolution.....	108

Tableau 16 : Comparaison des spectres d'absorption et des longueurs d'onde maximales d'absorption obtenus expérimentalement pour la sous-fraction F _{1,4} et les données bibliographiques de Jeffrey <i>et al</i> (1997), pour la violaxanthine, la néoxanthine, la prasinoxanthine et la siphonaxanthine.....	110
Tableau 17 : Comparaison des chromatogrammes à 435 nm, en mode analytique, de la sous-fraction F _{1,4} de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> , et d'un étalon commercial de violaxanthine. Comparaison des spectres d'absorption et des longueurs d'onde maximales d'absorption obtenues expérimentalement pour la sous-fraction F _{1,4} et pour la violaxanthine commerciale	112
Tableau 18 : Mortalité des cellules de la lignée MCF-7 en fonction de la concentration en violaxanthine après 72h d'incubation	117
Tableau 19 : Conditions de culture de <i>Cylindrotheca closterium</i>	131
Tableau 20 : Gradient et solvant utilisés en CLHP analytique = Gradient A	135
Tableau 21 : Gradient et solvant utilisés en CLHP analytique = Gradient B.....	135
Tableau 22 : Colonnes et Gradients de solvants sélectionnés en CLHP semi-préparative et préparative.....	137
Tableau 23 : Débits recommandés par Phenomenex pour l'utilisation des différents types de colonne.....	138
Tableau 24 : Quantité d'échantillon pouvant être séparé selon les types de colonne	138
Tableau 25 : Comparaison entre les gradients A et B des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> obtenus en mode analytique.....	140
Tableau 26 : Comparaison entre le gradient A et B des résolutions obtenues entre les différents pics des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	141
Tableau 27 : Comparaison entre les gradients A et B des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de <i>Cylindrotheca closterium</i> , obtenus en mode analytique	143
Tableau 28 : Comparaison entre le gradient A et B, des résolutions obtenues entre les différents pics des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de <i>Cylindrotheca closterium</i>	144

Tableau 29 : Comparaison entre le mode analytique et le mode semi-préparatif des résolutions obtenues entre les différents pics des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de <i>Dunaliella tertiolecta</i> , pour le gradient B	148
Tableau 30 : Gradient, débit et colonne utilisés pour l'analyse des extraits de microalgue ..	158
Tableau 31 : Tableau récapitulatif des meilleurs rendements d'extraction des pigments majoritaires de <i>Cylindrotheca closterium</i> obtenus pour chacune des méthodes d'extraction et les paramètres permettant d'obtenir les meilleurs rendements	171
Tableau 32 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec <i>Dunaliella tertiolecta</i>	175

LISTE DES EQUATIONS

Équation 1 : Equation permettant de déterminer le pourcentage de croissance des différentes lignées cellulaires pour le test au MTT.....	92
Équation 2 : Calcul de la résolution entre les différents pics d'un chromatogramme	136
Équation 3 : Calcul de la résolution	145

SOMMAIRE

Avant- propos	1
Chapitre 1 : Introduction bibliographique	2
Biologie et traitements du cancer par les molécules naturelles, potentiel des molécules issues de l'environnement marin	
Section 1 : Biologie du cancer.....	3
1 Le cycle cellulaire	3
1.1 <i>Le cycle cellulaire</i>	3
1.2 <i>Biologie du cancer</i>	5
1.3 <i>Genèse des cellules cancéreuses</i>	6
1.3.1 <i>Inactivation des gènes suppresseurs</i>	6
1.3.2 <i>Activation de proto-oncogènes.....</i>	6
1.3.3 <i>Accumulation des altérations génétiques</i>	7
1.3.4 <i>Défaut d'apoptose et tumorigenèse</i>	8
Section 2 : Traitements des cancers, modes d'action des anticancéreux et utilisation de molécules naturelles terrestres	14
1 Les différents traitements du cancer	14
1.1 <i>Les traitements locorégionaux</i>	14
1.1.1 <i>La chirurgie</i>	14
1.1.2 <i>La radiothérapie.....</i>	14
1.1.3 <i>La photothérapie dynamique des tumeurs.....</i>	15
1.2 <i>Les traitements systémiques</i>	15
1.2.1 <i>L'hormonothérapie.....</i>	15
1.2.2 <i>L'immunothérapie</i>	16
1.2.3 <i>La chimiothérapie.....</i>	17
2 Mode d'action des agents chimiothérapeutiques.....	17
2.1 <i>Les cibles pharmacologiques des agents anticancéreux.....</i>	17
2.2 <i>Les différentes classes d'agents anticancéreux.....</i>	19
2.2.1 <i>Les molécules cytotoxiques</i>	19
2.2.2 <i>Les thérapies ciblées.....</i>	22
2.3 <i>Importance des produits naturels dans les traitements du cancer.....</i>	29
2.3.1 <i>Les sources d'anticancéreux.....</i>	32

Section 3: L'environnement marin, source de molécules naturelles originales et actives pour le traitement des cancers 35

1 Biodiversité, chimiodiversité et pharmacodiversité du monde marin..... 35

1.1 *Origine de la pharmacodiversité du monde marin* 35

1.2 *Les premières découvertes en pharmacologie marine* 36

1.3 *Anticancéreux isolés à partir d'organismes marins* 39

1.3.1 Molécules cytotoxiques 40

1.3.2 Activateur du système immunitaire 45

1.3.3 Molécules inhibant l'angiogenèse 45

1.3.4 Molécules intervenant dans les voies de signalisation cellulaire et le cycle cellulaire 46

1.3.5 Inducteurs d'apoptose 48

1.4 *Molécules marines et mécanismes d'action* 49

2 Les Macroalgues et Microalgues marines : un vivier peu exploré de molécules anticancéreuses 50

2.1 *Biodiversité et originalité des Macroalgues et microalgues marines* 50

2.1.1 Définition des algues 50

2.1.2 Origine des différentes classes d'algues 50

2.1.3 Critères de classification des algues 53

2.2 *Données concernant les molécules naturelles antiprolifératives issues des algues* 66

2.2.1 Etudes menées sur les macroalgues 66

2.2.2 Potentiel des microalgues marines 69

2.2.3 Etudes menées sur les microalgues marines 70

2.2.4 Apport des biotechnologies 72

2.2.5 Conclusion : les microalgues marines, un vivier inexploré de molécules anticancéreuses 74

Section 4 : Positionnement et objectifs de l'étude 75

Chapitre 2..... 77

Evaluation du potentiel antiprolifératif d'extraits de microalgues marines.

Isolement d'un pigment antiprolifératif issu de *Dunaliella tertiolecta*

1 Contexte et démarche..... 78

2 Matériel et méthodes..... 79

2.1 *Sélection des espèces de microalgues marines* 79

2.1.1 Les espèces de microalgues étudiées 81

2.1.2 Conditions de culture des microalgues marines 82

2.2	<i>Préparation des extraits de microalgues marines</i>	84
2.2.1	Lyophilisation.....	84
2.2.2	Contraintes liées à la recherche bioguidée de molécules à activité antiproliférative 84	
2.2.3	Préparation des extraits de microalgues marines	84
2.3	<i>Evaluation de l'activité antiproliférative des extraits de microalgues marines</i>	86
2.3.1	Sélection des lignées cellulaires cancéreuses.....	86
2.3.2	Evaluation de l'activité antiproliférative des extraits.....	89
2.3.3	Protocole d'évaluation de l'activité antiproliférative des extraits.....	89
2.4	<i>Extraits à activité antiproliférative : purification bioguidée des principes actifs</i>	93
2.4.1	Démarche expérimentale.....	93
2.4.2	Analyse des extraits.....	94
2.4.3	Purification des molécules d'intérêt.....	95
2.5	<i>Caractérisation des molécules purifiées à activité antiproliférative</i>	95
2.5.1	Spectrométrie de masse haute résolution	95
2.5.2	Spectre d'absorption de la ou des molécules purifiées	95
2.6	<i>Evaluation de l'activité cytostatique</i>	96
2.6.1	Principe et protocole.....	96
2.7	<i>Evaluation de l'activité cytotoxique</i>	97
2.7.1	Principe.....	97
2.7.2	Protocole.....	97
2.8	<i>Evaluation de l'activité apoptotique</i>	98
2.8.1	Altération de la membrane plasmique.....	98
3	Résultats et discussion	100
3.1	<i>Résultats de la recherche bioguidée</i>	100
3.1.1	Sélection des extraits d'intérêt	100
3.1.2	Sélection des fractions d'intérêt de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	102
3.1.3	Sélection des sous-fractions d'intérêt de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	104
3.1.4	Résultats de la recherche bioguidée	106
3.2	<i>Caractérisation du principe actif de la sous fraction F1.4 de l'extrait dichlorométhanique de Dunaliella tertiolecta</i>	107
3.2.1	Résultat de la purification	107
3.2.2	Caractérisation de la molécule	108
3.3	<i>Etude de l'activité antiproliférative, cytostatique et apoptotique de la violaxanthine sur la lignée MCF-7</i>	115
3.3.1	Etude de l'activité antiproliférative.....	115
3.3.2	Etude de l'activité cytostatique de la violaxanthine.....	116
3.3.3	Etude de l'activité cytotoxique de la violaxanthine	117
3.3.4	Etude de l'activité apoptotique de la Violaxanthine	117
3.3.5	Discussion concernant l'activité antiproliférative et cytotoxique de la violaxanthine	119

4	Poursuite de l'étude et perspectives.....	125
4.1	<i>Extrait aqueux de <i>Polypodochrysis teissieri</i>.....</i>	<i>125</i>
4.2	<i>Activités et cibles de la violaxanthine</i>	<i>125</i>
4.3	<i>Activité antiproliférative des autres caroténoïdes</i>	<i>125</i>
5	Conclusion.....	126
	Chapitre 3.....	127
	Développements méthodologiques concernant l'extraction, l'analyse et la purification des pigments issus de microalgues marines	
	Section 1 : Contexte et démarche.....	128
1	Sélection des microalgues marines.....	129
2	Conditions de culture des microalgues marines	131
3	Sélection du solvant d'extraction	132
	Section 2 : Développement des méthodes d'analyse et de purification des pigments de microalgues marines	133
1	Les méthodes d'analyse de pigments de microalgues marines	133
2	Matériel et Méthodes	134
2.1	<i>Extraction des pigments de microalgues marines.....</i>	<i>134</i>
2.2	<i>Méthode d'analyse</i>	<i>134</i>
2.2.1	<i>Matériels.....</i>	<i>134</i>
2.2.2	<i>Gradient HPLC.....</i>	<i>134</i>
2.3	<i>Evaluation de l'efficacité de la méthode d'analyse</i>	<i>136</i>
2.4	<i>Passage de la méthode d'analyse à la méthode de purification</i>	<i>137</i>
2.5	<i>Evaluation de l'efficacité de la méthode de purification</i>	<i>138</i>
3	Résultats et discussion.....	139
3.1	<i>Développement du gradient analytique.....</i>	<i>139</i>
3.1.1	<i>Extrait de <i>Dunaliella tertiolecta</i>.....</i>	<i>139</i>
3.1.2	<i>Extrait de <i>Cylindrotheca closterium</i></i>	<i>142</i>
3.1.3	<i>Processus de développement de la méthode analytique.....</i>	<i>145</i>
3.2	<i>Efficacité de la méthode de purification</i>	<i>147</i>
4	Conclusion et perspectives.....	149

Section 3: Développement de procédés d'extraction de pigments issus de microalgues marines	151
1 Les méthodes d'extraction de principes actifs.....	151
1.1 Critères de sélection d'une méthode d'extraction.....	151
1.2 Méthodes d'extraction utilisées chez les végétaux et les microalgues marines.....	151
1.3 Les différentes méthodes d'extraction sélectionnées pour l'étude.....	153
1.3.1 Macération.....	153
1.3.2 UAE (Ultrasound Assisted Extraction).....	153
1.3.3 MAE (Microwaves Assisted extraction).....	154
2 Matériel et Méthodes	154
2.1 Extraction des pigments	154
2.1.1 Paramètres communs à toutes les méthodes d'extraction	154
2.1.2 Paramètres propres à chacune des méthodes d'extraction	154
2.2 Traitement des extraits pour analyses.....	156
2.3 Evaluation de l'efficacité des méthodes d'extraction	157
2.3.1 Intégrité des cellules de microalgues marines: Utilisation de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	157
2.3.2 Rendement d'extraction des pigments : dosage par CLHP.....	157
3 Résultats et discussion.....	159
3.1 Intégrité des cellules de microalgues marines: Utilisation de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	159
<i>Cylindrotheca closterium</i>	159
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	160
3.2 Rendement d'extraction des pigments : dosage par CLHP	162
3.2.1 Evaluation de l'efficacité des différentes méthodes sur la quantité de pigments extraits chez <i>Cylindrotheca closterium</i>	162
3.2.2 Evaluation de l'efficacité des différentes méthodes sur la quantité de pigments extraits chez <i>Dunaliella tertiolecta</i>	173
3.2.3 Effet de la composition de la paroi des microalgues sur l'extraction des pigments	176
3.2.4 Apport de la MAE et de la VMAE.....	177

4	Poursuite de l'étude et perspectives.....	178
4.1	<i>Développement de procédés d'extraction de pigments de microalgues marines.....</i>	<i>178</i>
4.1.1	Approche méthodologique - Utilisation des « plans d'expérience »	178
4.1.2	Ratio biomasse/solvant.....	178
4.1.3	Solvant d'extraction	178
4.1.4	Espèces de microalgues marines étudiées	179
4.1.5	Elargissement du champ d'investigation à tous les types de pigments.....	179
4.1.6	Elargissement du champ d'investigation à d'autres molécules.....	179
	Section 4 : Conclusion sur les développements méthodologiques.....	180
	Conclusion et perspectives.....	181
	Références	186

AVANT- PROPOS

Selon l’OMS, en 2004, le cancer était à l’origine de 7,4 millions de décès dans le monde, soit 13 % de la mortalité mondiale. D’ici à 2030, le nombre de décès par cancer devrait poursuivre sa progression et atteindre 12 millions de personnes.

En France, un homme sur deux et une femme sur trois développeront un cancer au cours de leur vie. Le cancer est devenu la première cause de mortalité en France et le sera bientôt à l’échelle mondiale.

La compréhension des différents mécanismes qui régissent l’apparition d’un cancer est l’un des aspects fondamentaux de la recherche contre le cancer. De nombreux efforts sont également réalisés pour développer de nouveaux outils diagnostiques toujours plus performants. Par ailleurs, la prévention joue un rôle important dans la lutte contre le cancer.

Les traitements représentent également un enjeu essentiel. Les progrès réalisés pour guérir le cancer sont indéniables notamment avec l’avènement de la chimiothérapie et le développement des thérapies ciblées.

A ce jour, certains cancers présentent des taux de survie de 95 % à cinq ans (lèvres, bouches et pharynx). A l’inverse des cancers comme celui du poumon présentent encore des taux de survies relativement faibles à cinq ans (14% de survie à 5 ans).

Le milieu naturel a toujours été une source très importante de molécules à activité biologique et 60% des anticancéreux utilisés à l’heure actuelle ont pour origine un produit naturel. Le monde marin est l’écosystème qui présente la plus grande diversité, avec de nombreux organismes sans équivalent terrestre. Par conséquent, chercher de nouveaux traitements dans le milieu naturel et en particulier dans le monde marin laisse entrevoir de nombreuses perspectives de réussite.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

BIOLOGIE ET TRAITEMENTS DU CANCER PAR LES

MOLECULES NATURELLES, POTENTIEL DES

MOLECULES ISSUES DE L'ENVIRONNEMENT MARIN

SECTION 1 : BIOLOGIE DU CANCER

1 LE CYCLE CELLULAIRE

1.1 LE CYCLE CELLULAIRE

Le cancer peut être défini comme une maladie liée à la prolifération incontrôlée et la dissémination dans l'organisme de cellules devenues anormales. Les processus qui régissent la division cellulaire sont donc très importants dans la cancérogénèse. La division cellulaire est contrôlée par le cycle cellulaire. Il a pour fonction de reproduire des cellules filles identiques à la cellule mère, et celles dont l'ADN est altéré sont réparées ou détruites (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1)¹. Le dérèglement des systèmes régissant et contrôlant l'avancement du cycle cellulaire est à l'origine de la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses.

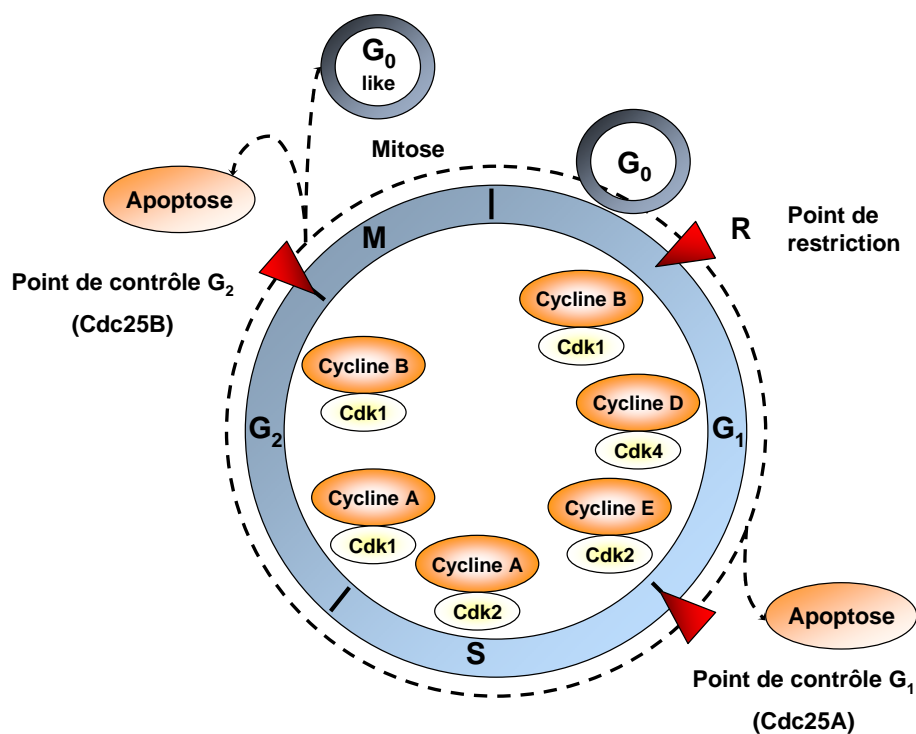


Figure 1 : Le cycle cellulaire (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1)

¹ Bernades-Genisson, V., Bernadou, J., Berque-Bestel, I., Brion, J.D., Couquelet, J., Cussac, M., Debaert, M., Duval, O., Giorgi-Renault, S., Huet, J., Lacroix, R., Laronze, J., Laronze, J.Y., Le Baut, G., Loiseau, P., Nuhrich, A., Plat, M., Poisson, J., Robert-Piessard, S., Tournaire-Arellano, C., Uriac, P. & Varache-Lembege, M. (Eds.) (2003) *Traité de chimie thérapeutique - Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers* Lavoisier.

Le cycle cellulaire est représenté sur la figure 1. Ce cycle concerne toutes les cellules activées par un facteur de croissance et comprend quatre étapes dont la chronologie est strictement déterminée : G_1 , S, G_2 , M :

- G_1 : synthèse des molécules nécessaires à la division cellulaire (désoxyribonucléotides, enzymes ...), il n'y a pas de réplication de l'ADN (cellule diploïde).
- S : réplication de l'ADN, la cellule $2n$ devient $4n$ (tétraploïde).
- G_2 : la cellule met en place les protéines du fuseau mitotique. Il y a séparation des deux centrosomes.
- M : mitose.

Les cellules qui ne sont pas dans le cycle cellulaire sont dites « quiescentes » et se trouvent en phase G_0 .

A l'état physiologique, la progression d'une cellule vers la phase suivante n'est possible que lorsque tous les événements relatifs à la phase précédente sont achevés. Le système possède deux points de contrôle (passage de G_1 à S et de G_2 à M) et un point de restriction R en G_1 . Chaque changement de phase du cycle cellulaire est précédé d'un contrôle sous la dépendance de kinases (CdK), de protéines activatrices (cyclines) ou inhibitrices (CKI, ou Cdk inhibitors). Les éléments clefs des événements majeurs du cycle cellulaire sont les enzymes à activité protéine kinase : les CdK. Elles sont régulées par deux types de mécanismes (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1) :

- des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation,
- par l'association avec des protéines activatrices, les cyclines.

L'activité des CdK est très faible au début de G_1 . Cette activité déclenche la formation des complexes de pré-réplication. Au milieu de la phase G_1 , l'activité des CdK est plus importante. Elle est due à l'association des CdK4 et CdK6 aux cyclines de type D. Parmi les substrats de ces enzymes, il y a la pRb (protéine régulatrice). La phosphorylation de pRb conduit à la transcription de plusieurs gènes, dont celui codant pour les cyclines E et A, CdK1 et les protéines intervenant dans la réplication. Le passage de G_1 à S (initiation de la réplication) est induit par l'activité des complexes CyclineE-CdK2 et CyclineA-CdK2. Le passage de G_2 à M est provoqué par l'activité des complexes CyclineA-CdK1 et CyclineB-CdK1, responsables de la phosphorylation de substrats tels que le cytosquelette, les histones et les protéines de l'enveloppe nucléaire (Karp, 2010).

Les Phosphatases Cdc25A, B et C déphosphorylent et activent les complexes CdK/cycline. Cdc25A permet le passage G1, S (activation de Cdk2-cycline E), alors que Cdc25B autorise la transition G2-M (activation de CdK1-CyclineB). CdC25A et CdC25B sont surexprimées dans de nombreux cancers (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1; Karp, 2010).

1.2 BIOLOGIE DU CANCER

Le cancer résulte de six altérations de la physiologie cellulaire (Hanahan & Weinberg, 2000). Ces altérations sont communes à toutes les cellules cancéreuses et sont à l'origine de leur prolifération incontrôlée.

La division cellulaire est induite par certains signaux (facteurs de croissance). Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité à produire elles-mêmes leurs propres signaux de croissance cellulaire et d'y être sensibles. Cette capacité s'accompagne de l'apparition d'une insensibilité aux différents signaux antiprolifératifs. Par ailleurs, l'apoptose, qui est l'un des moyens de destruction des cellules ne pouvant achever un cycle cellulaire normal, est absente (Cf. figure 1). Les cellules cancéreuses acquièrent également la capacité à se diviser à l'infini et à activer l'angiogenèse des capillaires sanguins à proximité. Enfin, la tumeur primaire envahit les tissus adjacents et dissémine des cellules pionnières dans l'organisme qui fonderont des tumeurs secondaires (métastases). Ces tumeurs distantes sont la cause de 90% des décès dans les cancers (Hanahan & Weinberg, 2000). Ces différentes altérations physiologiques sont représentées sur la figure 2.

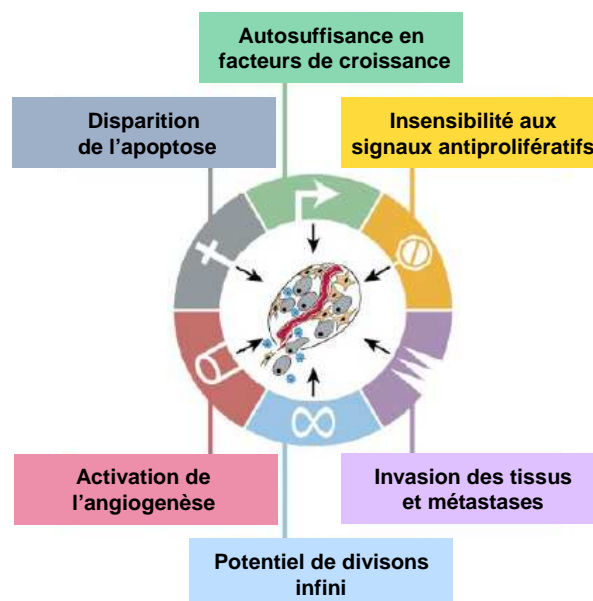


Figure 2 : Les six altérations physiologiques de la cellule conduisant à la formation de cellules cancéreuses (Hanahan & Weinberg, 2000)

1.3 GENESE DES CELLULES CANCEREUSES

Une cellule devient cancéreuse suite à une altération de son ADN. Il existe deux types de modifications génétiques conduisant à la formation d'une cellule cancéreuse (Karp, 2010; Lechat, 2006) :

- l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs,
- l'activation de proto-oncogènes en oncogènes.

1.3.1 Inactivation des gènes suppresseurs

Actuellement, plus de vingt gènes suppresseurs de tumeurs sont connus. Certains codent pour des facteurs de transcription comme p53 et WTI, d'autres pour des régulateurs du cycle cellulaires comme RB et p16, ou encore pour des protéines intervenant dans la régulation des systèmes de transmission (NF-I). La plupart des protéines codées par les gènes suppresseurs de tumeurs fonctionnent comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire (Karp, 2010).

La mutation la plus rencontrée dans les cancers humains, est celle du gène qui code pour la protéine p53 (50% des cancers). Elle est directement impliquée dans le processus de réparation de l'ADN et dans le phénomène d'apoptose. Une protéine p53 non fonctionnelle conduit à l'accumulation d'erreurs dans le génome pouvant amener à l'apparition d'une cellule cancéreuse (Yokota, 2000).

1.3.2 Activation de proto-oncogènes

Les cellules cancéreuses prolifèrent de manière incontrôlée. Cette propriété est liée à l'activation constitutive d'oncogènes cellulaires. A l'état physiologique, ces gènes se trouvent sous forme de « proto-oncogènes ». Ils sont impliqués dans les processus de croissance et de différenciation tissulaire. Ils sont induits en oncogènes par transformation virale, par mutation, par amplification ou translocation/dérépression génique.

Les oncogènes peuvent conférer aux cellules cancéreuses leur autonomie de croissance. Ils interviennent également dans la différenciation cellulaire et génèrent des erreurs dans les programmes de maturation cellulaire.

L'oncogène muté le plus fréquemment retrouvé dans les tumeurs humaines est Ras. Il code pour une protéine de fixation au GTP (Ras) régulatrice dans une des voies de contrôle de la prolifération cellulaire (Yokota, 2000; Lechat, 2006; Karp, 2010).

1.3.3 Accumulation des altérations génétiques

Dans les stades précoces du cancer, les cellules ne sont pas encore invasives et métastatiques. Au fil de la progression tumorale, les altérations de l'ADN s'accumulent avec l'apparition de nouveaux clones. Certains de ces clones acquièrent la capacité à métastaser et à former des tumeurs secondaires (Yokota, 2000) (Cf. figure 3).

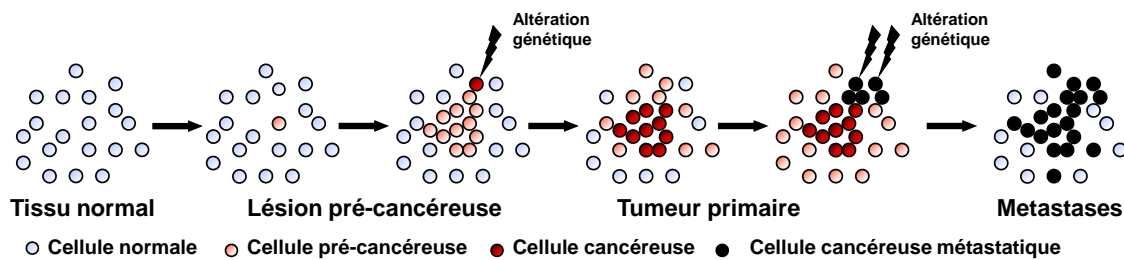


Figure 3 : Les différentes étapes de la progression tumorale, en association avec les altérations génétiques des cellules (Yokota, 2000)

Les cellules ayant accumulées le plus d'altérations génétiques seront donc retrouvées dans les tumeurs secondaires. La figure 3 montre que les métastases se forment à la fin du processus de cancérogénèse. La figure 4 représente l'ordre d'apparition des différentes caractéristiques de la cellule tumorale : autosuffisance en facteurs de croissance, insensibilité aux signaux antiprolifératifs, disparition du phénomène d'apoptose, apparition d'un potentiel de division cellulaire infini, induction de l'angiogenèse et capacité à former des métastases. Dans les différentes chronologies représentées (variables selon les types de cancers), la capacité à métastaser est souvent l'une des dernières caractéristiques acquises.

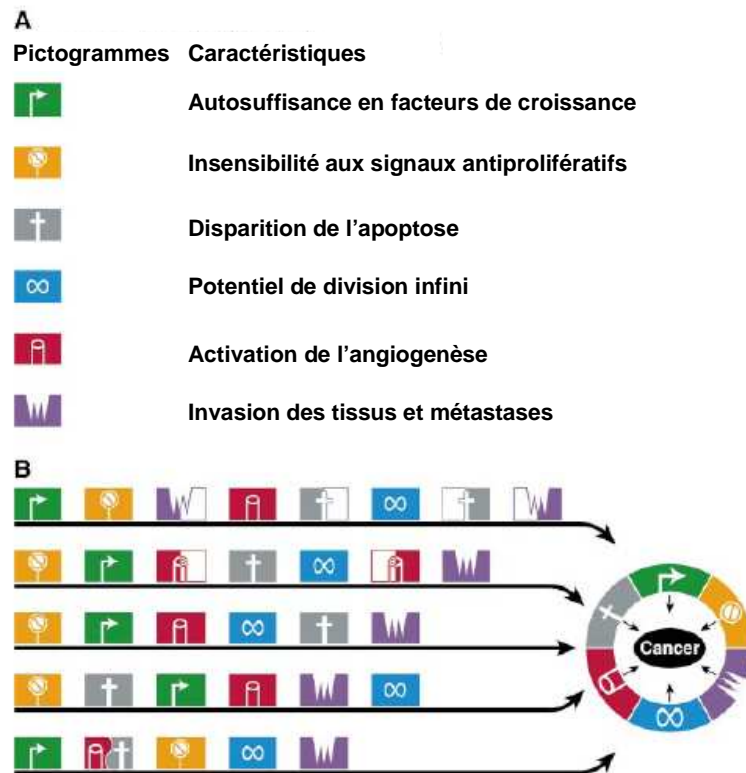


Figure 4 : Ordre d'apparition des différentes altérations physiologiques de la cellule conduisant à la formation de cellules cancéreuses (Hanahan & Weinberg, 2000). A : les différentes caractéristiques du cancer. B : chronologies d'apparition des caractéristiques de la cellule cancéreuse

1.3.4 Défaut d'apoptose et tumorigenèse

Le processus par lequel une cellule normale devient une cellule maligne ayant la capacité de former une tumeur requiert plusieurs dérèglements de la machinerie cellulaire. La disparition du phénomène d'apoptose (mort cellulaire programmée) est l'un de ces dérèglements.

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Un dérèglement peut être à l'origine de nombreuses pathologies. La disparition de ce phénomène est l'une des raisons qui explique la survenue d'un cancer. Il existe d'autres types de mort cellulaire, comme la nécrose, la sénescence ou encore l'autophagie qui ne compensent qu'en partie la disparition du phénomène d'apoptose chez les cellules tumorales. Par conséquent, de nombreuses recherches se focalisent sur les voies cellulaires qui régissent ce phénomène afin que l'apoptose puisse être restaurée chez les cellules cancéreuses (de Bruin & Medema, 2008).

1.3.4.1 Les différentes voies régulant l'apoptose

Le terme d'apoptose regroupe des caractéristiques morphologiques que possèdent les cellules apoptotiques comme l'altération de la membrane plasmique ou la formation de corps apoptotiques (Kerr, 1972).

Durant l'apoptose, la membrane plasmique perd son asymétrie et les phosphatidylsérines (Ps) se trouvent exposées à l'extérieur de la cellule. Ce changement d'orientation des Ps est un signal pour les macrophages qui participent alors à la destruction des cellules entrées en apoptose. Ce type de mort cellulaire ne déclenche pas d'inflammation (Fadok *et al.*, 2000). C'est un phénomène finement régulé. Il peut être initié par deux types de signaux : des signaux de stress intracellulaires ou par des ligands extracellulaires. Les différentes voies qui régissent l'apoptose sont présentées sur la figure 5.

Les signaux de stress intracellulaire comme les dommages de l'ADN, le stress oxydatif ou l'activation d'oncogène conduisent à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et à la libération de cytochromes c. Ce processus est étroitement régulé par les protéines de la famille Bcl-2, qui peuvent jouer à la fois un rôle pro ou anti-apoptotique. Parmi cette famille de protéines, Bax et Bak sont connues pour induire la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale en formant des pores (oligomérisation) (Kuwana *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2001). Les protéines de la famille BH3 (strictement pro-apoptotiques), comme Bid, Bim, Bad, Noxa et Puma activent Bax et ou Bak.

Deux modèles ont été proposés pour cette activation (Certo *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005; Kuwana *et al.*, 2005; Letai *et al.*, 2002):

- certaines études suggèrent que l'activation se fait *via* la liaison des protéines BH3 aux protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w et Mcl-1), ce qui lève l'inhibition de l'apoptose exercée par ces protéines.
- d'autres études suggèrent qu'un sous-ensemble de protéines BH3 peut directement se lier et activer Bax et, ou Bak.

Le relargage du cytochrome c conduit à la formation d'un complexe : « l'apoptosome », constitué du cytochrome c, d'Apaf-1 et de la pro-caspase-9. La caspase-9 est autoactivée par la proximité générée par la formation de l'apoptosome (Boatright *et al.*, 2003; Pop *et al.*, 2006; Stennicke *et al.*, 1999). La caspase-9 clive et active les caspases effectrices (de Bruin & Medema, 2008).

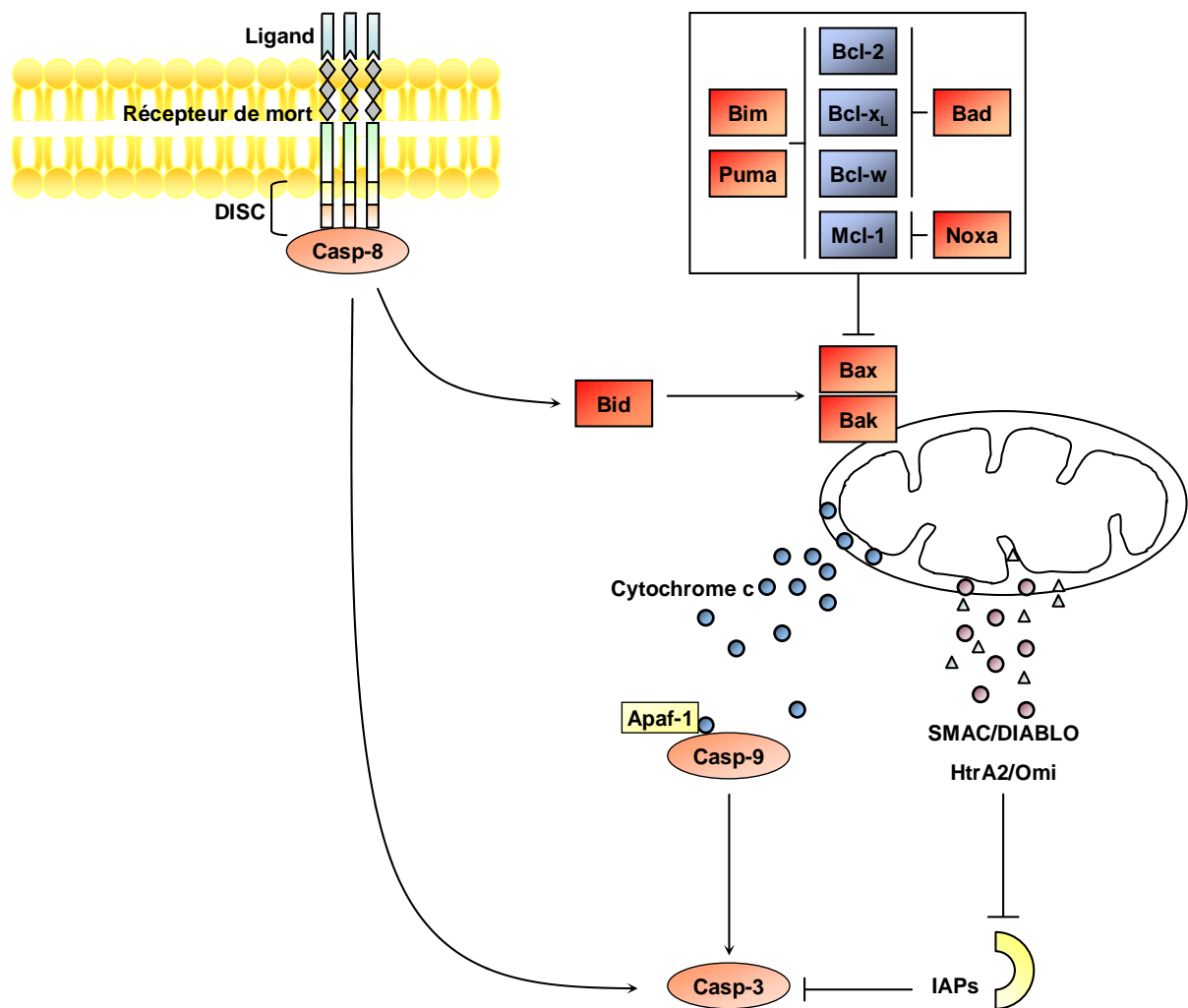


Figure 5 : Régulation de l'apoptose. Voie intracellulaire et voie extracellulaire (de Bruin & Medema, 2008)

Lorsque les ligands extracellulaires comme Fas, le TNF α ou TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) se lient à leurs récepteurs, les domaines intracellulaires de ces récepteurs regroupent alors des protéines adaptatrices (comme FADD et TRADD) ainsi que les pro-caspases-8 et -10. Cet ensemble forme le DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Nagata, 1997). Les caspases-8 et -10 sont activées au niveau du DISC (Bao & Shi, 2006; Boatright *et al.*, 2003; Donepudi *et al.*, 2003). Cette activation est contrôlée par les protéines c-FLIP (cellular FLICE inhibitory proteins). Les deux formes de cette protéine la petite (c-FLIP_S) et la grande (c-FLIP_L) empêchent l'activation des caspases (bien qu'il soit supposé que c-FLIP_L facilite la liaison et donc l'activation des caspases quand elle est faiblement exprimée) (Chang *et al.*, 2002; Hyer *et al.*, 2006; Micheau *et al.*, 2002; Sharp *et al.*, 2005).

Lorsque la caspase-8 est activée, le signal de l'apoptose se propage *via* le clivage direct des caspases effectrices (de Bruin & Medema, 2008; Li *et al.*, 1998).

Toutefois, les voies intracellulaires et extracellulaires de l'apoptose deviennent communes au niveau de la mitochondrie. En effet, la caspase-8 peut aussi cliver la protéine Bid en sa forme active tBid. En devenant un membre pro-apoptotique de la famille des protéines Bcl-2, t-Bid active Bax/Bak ce qui provoque le relargage de cytochrome c (Li *et al.*, 1998).

Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases effectrices (-3, -6 et -7) qui sont les principales protéases qui vont dégrader la cellule. Leur activité est, au moins dans une certaine mesure, tenue en échec par IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Roy, 1995). IAPs est elle-même inhibée par les protéines SMAC/DIABLO (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000) et la sérine-protéase HTrA2/Omi (Suzuki *et al.*, 2001). Ces protéines sont également relarguées par la mitochondrie, probablement en même temps que le cytochrome c pour atténuer le signal inhibiteur et pour amplifier le signal apoptotique (Bremer *et al.*, 2006; de Bruin & Medema, 2008).

Les caspases effectrices ont une action sur (Karp, 2010) :

- Une douzaine de protéines kinases.
- Des lamines, qui forment la limite interne de l'enveloppe nucléaire. La scission des lamines aboutit à la dégradation de la lame nucléaire et à la contraction du noyau.
- Des protéines nécessaires à la structure cellulaire, comme celles des filaments intermédiaires : l'actine et la gelsoline. Le découpage de ces protéines et l'inactivation qui en découle conduisent à des changements de la forme de la cellule.

Les caspases sont également responsables du clivage de la PARP (poly ADP ribose polymérase), enzyme essentielle située dans le noyau. Elles activent des protéines douées d'activité endonucléasique telles que les CAD (Caspase- Activated DNase) et le facteur de fragmentation DFF (DNA Fragmentation Factor) (Karp, 2010).

1.3.4.2 Apoptose et tumorigénèse

L'apoptose est reconnue comme la plus grande barrière que doivent contourner les cellules tumorales. Cette barrière franchie, elles peuvent alors survivre et proliférer. Les cellules cancéreuses acquièrent une résistance à l'apoptose en adoptant plusieurs stratégies :

- La perte de fonction par mutation de la protéine p53, qui est un suppresseur de tumeur, est fréquemment observée. En effet, p53 est promotrice de l'apoptose, en activant la transcription des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, dans des contextes où l'ADN est endommagé. Une protéine p53 non-fonctionnelle peut donc être directement reliée à un défaut d'induction de l'apoptose après un stress cellulaire.
- D'autres modifications anti-apoptotiques sont observées dans les tumeurs humaines, elles impliquent la famille des protéines Bcl-2 et IAP. Une perte de fonction des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak ou le haut niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques conduit à l'inhibition de l'apoptose.

Des modifications dans les voies des récepteurs de mort peuvent aussi jouer un rôle dans la résistance à l'apoptose (Bremer *et al.*, 2006; de Bruin & Medema, 2008).

1.3.4.3 Modifications morphologiques et biochimiques au cours de l'apoptose

Les cellules qui rentrent en apoptose montrent des changements biochimiques et morphologiques caractéristiques. Ces différents changements sont présentés dans le tableau 1. Ils comprennent l'agrégation de la chromatine, la condensation du cytoplasme et du noyau, la partition du cytoplasme et du noyau en petites vésicules (appelées corps apoptotiques). Ils contiennent des ribosomes, des mitochondries intactes et du matériel nucléaire. *In vivo*, ces corps apoptotiques sont rapidement reconnus et phagocytés par les macrophages et les cellules épithéliales adjacentes. En raison de ce mécanisme très efficace de destruction des cellules apoptotiques, la réponse inflammatoire n'est pas déclenchée (Cohen, 1993).

Tableau 1 : Changements morphologiques et biochimiques chez la cellule durant l'apoptose (Cohen, 1993).

Changements morphologiques	Changements biochimiques	Signification physiologique
<ul style="list-style-type: none"> ○ Bourgeonnement de la membrane sans perte d'intégrité ○ Agrégation de la chromatine au niveau de la membrane nucléaire ○ Diminution du volume cytoplasmique et condensation du noyau ○ Fragmentation de la cellule ○ Formation de vésicules (corps apoptotiques) ○ La mitochondrie devient perméable à cause de la formation de pores 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Procédé étroitement régulé enzymatiquement ○ Fragmentation non aléatoire de l'ADN (marque caractéristique de l'apoptose) ○ Relargage dans le cytoplasme par les mitochondries de facteurs activateurs de l'apoptose (cytochrome c) ○ Activation de la cascade des caspases ○ Altération de la membrane (translocation des PS du coté extracellulaire de la membrane plasmique) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Affecte des cellules individuelles ○ Induite par des stimuli : <ul style="list-style-type: none"> - absence de facteurs de croissance - changement de l'environnement hormonal ○ Pas de réponse inflammatoire ○ Phagocytose par les cellules épithéliales adjacentes et les macrophages

SECTION 2 : TRAITEMENTS DES CANCERS, MODES D'ACTION DES ANTICANCEREUX ET UTILISATION DE MOLECULES NATURELLES TERRESTRES

1 LES DIFFERENTS TRAITEMENTS DU CANCER

Pour traiter les cancers, il existe deux grands types de traitements. Les traitements locorégionaux qui agissent directement sur la tumeur, et les traitements systémiques qui ne sont pas ciblés. Les différents traitements sont généralement couplés.

1.1 LES TRAITEMENTS LOCOREGIONAUX

1.1.1 La chirurgie

La chirurgie a été le premier traitement utilisé pour lutter contre le cancer, notamment pour traiter les petites tumeurs localisées ou les tumeurs solides à développement lent qui représentent 70% des cancers.

Elle consiste en l'ablation de la tumeur et est souvent associée à d'autres thérapies telles que la chimiothérapie, la radiothérapie ou l'hormonothérapie. Ce traitement est le seul moyen de traiter les zones peu vascularisées où la chimiothérapie n'accède pas.

1.1.2 La radiothérapie

L'alternative à la chirurgie, lorsque l'organe atteint doit être préservé, est la radiothérapie. La radiothérapie agit localement sur la région irradiée. Tous les types de radiothérapie sont basés sur l'ionisation. Les particules émises (électrons, photons X ou γ , protons) interagissent avec l'eau des cellules pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS), provoquant la destruction des cellules adjacentes. Il existe différents types de radiothérapie :

- La radiothérapie transcutanée : ce traitement est basé sur un générateur de rayonnement qui se situe en dehors du corps. Les faisceaux de radiations émis par ce générateur traitent la tumeur.
- L'irradiation interstitielle ou curiethérapie : cette technique consiste à implanter temporairement dans la tumeur ou à proximité des sources radioactives.
- La radiothérapie métabolique : cette méthode repose sur l'utilisation de molécules à pouvoir ionisant se fixant sélectivement sur la tumeur. La molécule est injectée dans l'organisme.

1.1.3 La photothérapie dynamique des tumeurs

La photothérapie dynamique repose sur l'utilisation combinée d'une substance photosensibilisante et d'une irradiation lumineuse appropriée (LASER) qui pénètre bien les tissus. La substance photosensibilisante est destinée à se concentrer le plus sélectivement possible dans les tissus à traiter. L'irradiation déclenche la photooxydation du photosensibilisant, ce qui va provoquer un stress oxydatif (production localisée de ROS) et entraîner la mort cellulaire (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 38; Chaleix, 2003; Gachard-Bouty, 2003) (Cf. Figure 6). La substance photosensibilisante peut être administrée soit par voie intraveineuse soit par voie topique (Detty *et al.*, 2004). La plupart des molécules utilisées en photothérapie des tumeurs sont des dérivés de porphyrines tels que le porfimère sodique ou des chlorines, des bactériochlorines, ou des téxaphyrines.

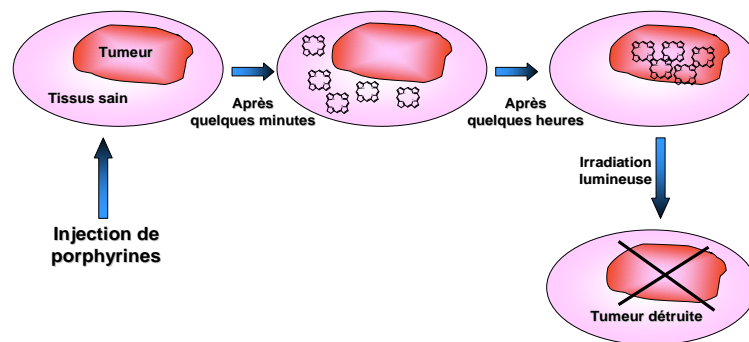


Figure 6 : Représentation du principe de la PDT (Gachard-Bouty, 2003)

1.2 LES TRAITEMENTS SYSTEMIQUES

1.2.1 L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est utilisée pour lutter contre les cancers dont le développement est dépendant d'hormone. Ce traitement est particulièrement efficace dans les cancers du sein et de la prostate. Il inclut des médicaments dont l'action consiste à stopper la production de certaines hormones et à modifier leur fonctionnement.

1.2.2 L'immunothérapie

L'approche immunothérapeutique est basée sur la modification et l'exploitation des mécanismes cellulaires de défense de l'hôte ou sur le contrôle de la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules du système immunitaire.

L'immunothérapie passive est une méthode qui utilise des anticorps comme agents thérapeutiques. Ces anticorps reconnaissent et s'unissent à des protéines spécifiques à la surface des cellules tumorales. Après sa fixation, l'anticorps dirige une attaque contre la cellule en mobilisant d'autres éléments du système immunitaire. Actuellement, une vingtaine d'anticorps monoclonaux a été approuvée pour le traitement du cancer et d'autres maladies. L'herceptine est un anticorps humanisé dirigé contre un récepteur de la surface cellulaire Her2. Il fixe le facteur de croissance Her2 favorisant la prolifération des cellules du cancer du sein surexprimé dans 25% des cancers du sein. Le Rutixan™ est utilisé pour le traitement du lymphome à cellules B autre que celui de Hodgkin. Il s'unit à la protéine CD20 de la surface des cellules B malignes. Dans 95% des cas, l'union de l'anticorps à la protéine CD20 bloque la croissance de la cellule et induit l'apoptose (Karp, 2010).

Une approche active fait appel à l'usage des modulateurs de l'immunité comme les cytokines avec notamment les interférons (IFN), les interleukines (IL) et les TNF.

Pour les IFN, le mécanisme comporte la liaison de l'IFN (α , β , γ) à un récepteur spécifique de la membrane de la cellule cible qui déclenche une série de réactions intracellulaires ayant pour résultat la synthèse d'ARN et de protéines. Par leur intermédiaire, une triple activité est mise en jeu : antivirale, antiproliférative et immunomodulatrice (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 37).

L'IL1 stimule la prolifération des lymphocytes. Elle est libérée par les macrophages après captation de l'antigène (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 37).

L'IL2 stimule la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et agit comme un facteur de croissance pour les lymphocytes NK pour conduire aux lymphocytes T tueurs activés. Elle provoque la libération d'IFN γ et de TNF α (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 37).

La famille des TNF comprend deux cytokines très voisines (TNF α et β) qui jouent un rôle important dans le développement de la réponse immunitaire. Le TNF α est un facteur de nécrose tumorale mais également un médiateur essentiel du système immunitaire et est un messenger dans les phénomènes de l'inflammation (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 37).

1.2.3 La chimiothérapie

La chimiothérapie isolée n'est indiquée que dans de très rares cas. Dans la plupart des cas une combinaison de deux ou de trois approches est nécessaire (Lechat, 2006).

Lorsque le cancer prolifère et crée des tumeurs secondaires, les traitements locaux tels que la radiothérapie et la chirurgie ne sont plus adaptés. La chimiothérapie est utilisée afin de soigner un cancer en bloquant la prolifération cellulaire, en réduisant la taille de la tumeur, et en prévenant la formation des tumeurs secondaires.

2 MODE D'ACTION DES AGENTS CHIMIOThERAPEUTIQUES

2.1 LES CIBLES PHARMACOLOGIQUES DES AGENTS ANTICANCEREUX

Le but des agents anticancéreux est d'atteindre les cellules tumorales afin de les détruire, par interaction avec une ou plusieurs cibles pharmacologiques (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1).

La figure 7 résume les différentes cibles potentielles de la chimiothérapie

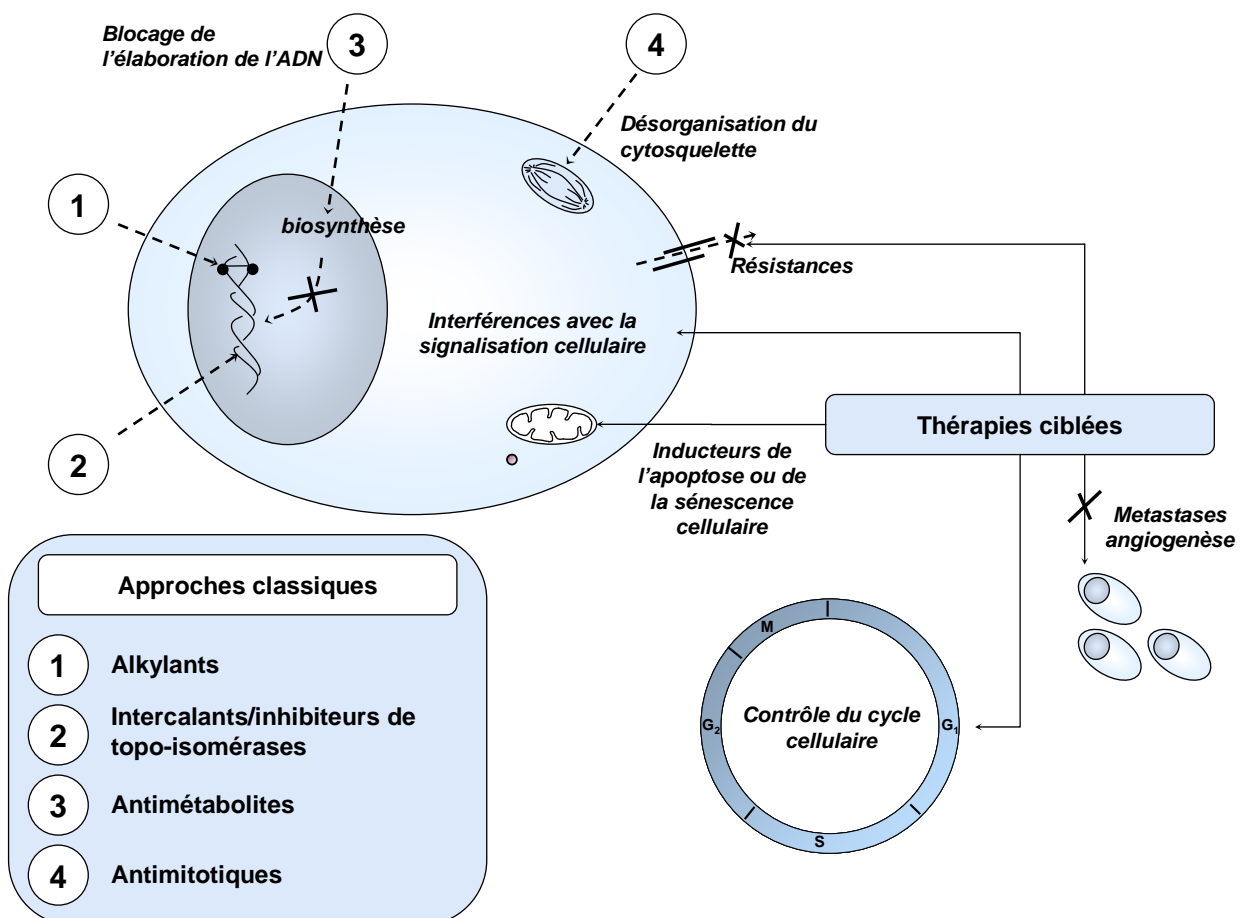


Figure 7 : Les cibles des agents antitumoraux (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1)

Une des principales cibles des traitements anticancéreux est l'ADN. Il a un rôle capital dans la vie de la cellule. Les molécules anticancéreuses peuvent interagir avec l'ADN de trois manières différentes (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1):

- par liaison à l'ADN (agents alkylants),
- en interagissant avec les systèmes de réparation de l'ADN (intercalants, inhibiteurs de topo-isomérase)
- en bloquant la biosynthèse des constituants de l'ADN (antimétabolites).

Les autres anticancéreux sont les molécules qui perturbent le fuseau mitotique, et empêchent la division cellulaire (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1).

Enfin d'autres approches sont développées comme celles qui (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 1):

- restaurent le phénomène d'apoptose,
- restaurent les systèmes de contrôle du cycle cellulaire,
- inhibent l'angiogénèse,
- interviennent dans les voies de signalisation cellulaire.

2.2 LES DIFFERENTES CLASSES D'AGENTS ANTICANCEREUX

2.2.1 Les molécules cytotoxiques

2.2.1.1 Les molécules interagissant avec l'ADN

Les agents alkylants se fixent de façon covalente sur les atomes de soufre, d'azote, d'oxygène, d'azote des bases et sur les groupements phosphates de l'ADN. Leur effet cytotoxique est lié en grande partie à l'alkylation des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Les agents alkylants interviennent essentiellement au moment de la réplication de l'ADN (phase S) quand les deux brins sont séparés et exposent ainsi les sites d'intérêt à l'action alkylante. Il existe huit familles d'agents alkylants (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 3):

- les moutardes à l'azote,
- les oxazaphosphorines (cyclophosphamide et ifosfamide),
- les aziridines (thiotépa et mitomycine),
- les nitrosourées (carmustine, lomustine),
- les sulfonates d'alkyle,
- les triazènes,
- la mitomycine C,
- les complexes du platine.

La figure 8 représente la structure chimique de la mitomycine C. Les mitomycines sont une famille d'antibiotiques à activité antitumorale extraites du milieu de la fermentation de *Streptomyces caespitosus* (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 8).

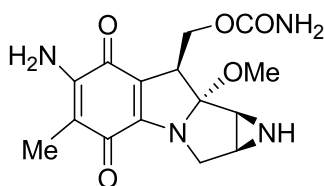


Figure 8 : Structure chimique de la mitomycine C

Parmi les molécules interagissant avec l'ADN, certaines induisent ou stabilisent les coupures de l'ADN. Les principaux représentants de cette classe sont les inhibiteurs de topo-isomérases. Leur rôle est de maîtriser les phénomènes de sous et surenroulement du matériel nucléaire. Elles sont essentielles à la résolution des problèmes topologiques accompagnant la réplication et la transcription de l'ADN, l'assemblage de la chromatine, la recombinaison et la séparation des chromosomes. Les molécules agissant sur les topo-isomérases sont classées en deux groupes (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 13):

- celles qui sont actives sur les topo-isomérases I,
- celles qui sont actives sur les topo-isomérases II.

La camptothécine et ses dérivés sont des inhibiteurs de la topo-isomérase I. Les épipodophyllotoxines, les anthracyclines, le mitoxantrone, le bisantrène, l'amsacrine, la dactinomycine, l'acétate d'elliptidium et les bléomycines sont des inhibiteurs de topo-isomérase II. La figure 9 représente la structure chimique du mitoxantrone. Le motif tricyclique anthraquinonique est présent dans la structure de nombreuses substances naturelles largement répandues dans le monde végétal. L'utilisation de dérivés anthraquinoniques en chimiothérapie est issue de criblages systématiques réalisés par le National Cancer Institute (NCI) (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 14).

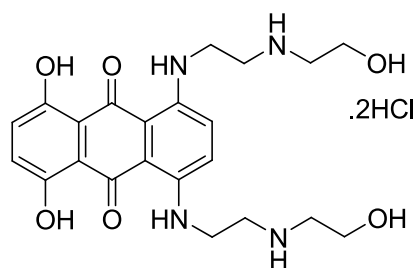


Figure 9 : Structure chimique du mitoxantrone

La dernière classe de molécules intervenant avec l'ADN sont les antimétabolites. Ils interfèrent dans la synthèse des acides nucléiques en inhibant la biosynthèse des nucléotides et des acides nucléiques ou en s'incorporant dans les acides nucléiques par l'un (ou les deux) des mécanismes suivants (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 23):

- Par inhibition de la biosynthèse des nucléotides et des acides nucléiques.
- Par incorporation dans les acides nucléiques.

Il existe plusieurs classes d'antimétabolites :

- les antiprimidines comme le fluorouracile, la cytarabine et la gemtabine,
- les antipurines comme la mercaptopurine, la cladribine, la fludarabine et la pentostatine,
- les antifoliques comme le méthotrexate et le folinate de Ca^{2+} ,
- les inhibiteurs des ribonucleotides réductases comme les hydroxycarbamides.

La figure 10 représente la structure chimique du 5-fluorouracile. La synthèse de 5-fluorouracile a été effectuée en 1957 par Heidelberger. Cette molécule est un analogue de l'uridine où l'hydrogène en position 5 est remplacé par un atome de fluor. Cette substitution est responsable de l'inhibition de la thymidylate synthase (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 24).

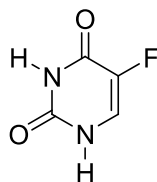


Figure 10 : Structure chimique du fluorouracile

2.2.1.2 Principes actifs interférant avec la tubuline et les microtubules

Les antimitotiques sont des composés qui bloquent la mitose et conduisent à l'apoptose des cellules traitées. Leur action s'exerce essentiellement sur la formation et la fonctionnalité du fuseau mitotique constitué par l'auto-assemblage de la tubuline.

Les microtubules sont des structures dynamiques en constante évolution soumis à des séquences de polymérisation-dépolymérisation. Les différentes molécules intervenant sur la formation du fuseau mitotique peuvent être classées en fonction de leur mécanisme d'action en deux groupes (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 28).

Les inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline empêchent la formation du fuseau mitotique. Parmi ces inhibiteurs, sont retrouvés les vinca-alcaloïdes, la colchicine et ses dérivés.

Les inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules agissent en complexant la tubuline et se comportent comme des stabilisateurs du fuseau. Les taxoïdes, les diterpènes tétracycliques, les macrolides, comme les épothilones sont des inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules. La figure 11 représente la structure chimique de la colchicine 1. Cette molécule est l'archétype des substances actives sur la tubuline et la mitose. Elle n'est pas utilisée comme antitumoral en raison de sa toxicité. Cependant certains de ses dérivés ont révélé un intérêt comme antitumoraux (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 29).

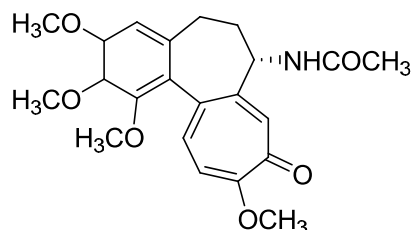


Figure 11 : Structure chimique de la colchicine 1

2.2.2 Les thérapies ciblées

Au cours des traitements, la tumeur peut devenir résistante. Plusieurs mécanismes expliquent ce phénomène, comme la diminution de la concentration intracellulaire du cytotoxique, ou la mise en place de systèmes de détoxification. La résistance peut être également due à une altération des cibles des anticancéreux, ou par réparation des dommages causés par les agents alkylants sur l'ADN (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 42).

Les efforts de recherches sont donc dirigés vers la mise en évidence de médicaments agissant plus sélectivement sur le fonctionnement de la cellule tumorale en restaurant l'apoptose, en régulant le cycle cellulaire ou les différentes voies de signalisation cellulaire.

2.2.2.1 Régulation des voies de signalisation

La mise en évidence de molécules régulant les voies de signalisation cellulaire permet d'agir sur les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire.

Dans les cellules tumorales, les voies de signalisation sont souvent déséquilibrées par la surexpression d'une protéine déterminée. Les molécules régulant les voies de signalisation sont pour la plupart des inhibiteurs dirigés vers des enzymes cibles.

Parmi ces cibles, il y a (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 44):

- les kinases et les phosphatases comme les récepteurs à tyrosine-kinase transmembranaires, les tyrosines kinases cytoplasmiques et nucléaires,
- les sérines thréonine kinases du cycle cellulaire,
- les phospholipases,
- les protéines kinase C intervenant dans la signalisation intracellulaire.

Outre, cette action sur les kinases et les phosphatases, les voies de signalisation peuvent être régulées en agissant sur (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 44):

- certaines transférases comme les farnésyls et géranylgeranyl-tranférases nécessaires au processus d'expression des gènes,
- des reverse-transcriptases comme les télomérases.
- les protéases de la matrice extracellulaire impliquées dans l'angiogénèse.

L'apoptose peut être induite en activant des protéases comme les caspases ou bien en agissant sur la cyclooxygénase 2 impliquée dans l'augmentation du taux de protéines apoptotiques.

2.2.2.2 Régulation du cycle cellulaire

Chaque changement de phase du cycle cellulaire est précédé d'un contrôle sous la dépendance de kinases (Cdk), de protéines activatrices (cyclines) ou inhibitrices (CKI, ou Cdk inhibitors). Plusieurs stratégies ciblées sur différents événements du cycle cellulaire peuvent conduire à la mort de la cellule par apoptose ou sénescence. Les inhibiteurs de Cdk comme le flavopiridol font partie de ces stratégies. Les inhibiteurs du protéasome (système impliqué dans le contrôle général du cycle cellulaire) entraînent la dégradation de l'inhibiteur du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) participant à la défense des cellules soumises à une radio ou chimiothérapie. Les inhibiteurs des histones déacétylases conduisent à l'hyperacétylation des histones et à la mort cellulaire. La figure 12 représente la structure chimique du flavopiridol (Traité de chimie thérapeutique, chapitre 44; Karp, 2010).

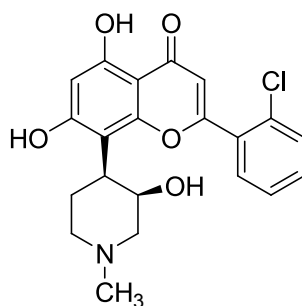


Figure 12 : Structure chimique du flavopiridol

2.2.2.3 Molécules angiostatiques

L'angiogénèse résulte d'un équilibre entre des facteurs pro et anti-angiogéniques. Lors de la tumorigénèse, un phénomène dénommé « switch angiogénique » conduit à la rupture de cet équilibre. Les facteurs proangiogéniques sont alors surexprimés.

Ce processus de néoangiogénèse tumorale est stimulé par des facteurs de croissance sécrétés dans l'environnement tumoral, en réponse à des stimulations diverses (hypoxie, inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, modifications épigénétiques...). Trois facteurs proangiogéniques principaux jouent un rôle important dans la progression angiogénique et représentent des cibles thérapeutiques d'intérêt: le Vascular-Endothelial Growth Factor (VEGF), le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) et le Fibroblast Growth Factor (FGF) (You & Trillet-Lenoir, 2006).

2.2.2.4 Induction de l'apoptose : les différentes cibles moléculaires et cellulaires

L'apoptose apparaît comme un des mécanismes responsables des effets de toutes chimiothérapies. Les anomalies des voies apoptotiques favorisent la prolifération des cellules tumorales.

Pour rétablir le phénomène d'apoptose dans les cellules cancéreuses, il existe de nombreuses cibles moléculaires (Bremer *et al.*, 2006). Par exemple, l'apoptose peut être induite par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Les cellules tumorales expriment à leur surface des molécules différentes de celles retrouvées chez les cellules normales. L'utilisation d'un anticorps conjugué à une molécule apoptotique est l'une des voies envisageables (Sievers, 2003).

Dans une autre mesure, l'activation directe de la machinerie apoptotique chez les cellules cancéreuses est possible en utilisant des formes solubles recombinantes du TNF (Tumor Necrosis Factor). Le TNF, le FASL et TRAIL sont les molécules effectrices majeures de l'apoptose (Bremer *et al.*, 2006).

Les galectines sont des molécules capables de provoquer la mort spécifiquement chez la cellule cancéreuse (Liu & Rabinovich, 2005). Elles appartiennent à la famille des lectines (glycoprotéines) qui présentent une affinité avec les résidus β -galactosides des glycoprotéines de la membrane cellulaire des cellules normales et cancéreuses. Cependant, après la liaison des galectines, la réponse est différente chez la cellule cancéreuse et la cellule normale. Par exemple, la galectine 1 bloque le cycle cellulaire à la fin de la phase S en altérant l'expression des protéines contrôlant le cycle cellulaire comme le facteur de transcription E2F1. Chez la cellule cancéreuse ce blocage est suivi par l'activation de l'apoptose (Ravatn *et al.*, 2005; Mallucci *et al.*, 2003).

L'homéostasie des protéines de la cellule joue un rôle primordial dans la survie cellulaire et est strictement régulée par la voie ubiquitine-protéasome (Mani & Gelmann, 2005). Elle contrôle la demi-vie de la majorité des protéines cellulaires. Le bortezomide est un des inhibiteurs de cette voie. Un point fort du bortezomide est son action ciblée sur les cellules cancéreuses. L'apoptose provoquée par cette molécule est caractérisée par la stabilisation de p53 et une augmentation de l'expression de NOXA (protéine pro-apoptotique de la famille BH-3). La structure chimique du bortezomide est présentée sur la figure 13.

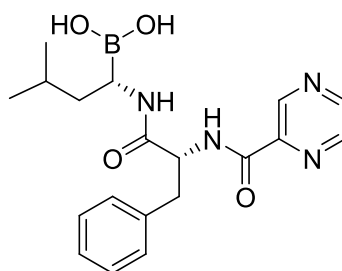


Figure 13 : Structure chimique du bortezomibe

Les protéines anti et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 jouent un rôle primordial dans le contrôle des mécanismes de l'apoptose (Breckenridge & Xue, 2004). Dans les cancers, les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-x1 sont fréquemment surexprimées. L'inhibition spécifique de ces protéines est donc une des voies de recherche pour induire l'apoptose (Badros *et al.*, 2005). Par exemple, l'utilisation de l'ABT-737 (Cf. figure 14) provoque l'inhibition de ces protéines avec une forte sélectivité. Cette molécule montre une régression de la tumeur chez 77% des souris (sans tumeurs secondaires) traitées. Dans une autre mesure, l'interaction avec Bax et, ou Bak est une des cibles également à l'étude (Oltersdorf *et al.*, 2005; Fleischer *et al.*, 2006).

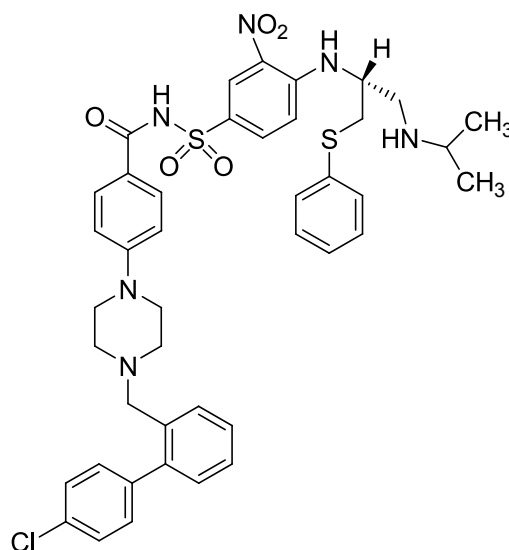


Figure 14 : Structure chimique de l'ABT-737

Les protéines IAPs inhibent les caspases, elles sont un point de contrôle important de l'apoptose. XIAP a été la première représentante identifiée de cette famille. Elle est surexprimée dans de nombreux cancers (Schimmer, 2004). Elle inhibe la caspase-9 initiatrice et la caspase-3 effectrice de l'apoptose. Les peptides dérivant de la protéine SMAC inhibent XIAP (Bockbrader *et al.*, 2005).

Enfin, pour restaurer l'apoptose, l'action directe dans le noyau cellulaire par restauration de l'activité de p53 (Bykov *et al.*, 2002; Vogelstein *et al.*, 2000) ou par inhibition de l'induction de HIF-1 α , impliqué dans l'hypoxie du micro-environnement tumoral contribuant à la progression de la tumeur, sont également des voies envisageables (Leek *et al.*, 2005).

Les inhibiteurs des histones-déacétylases ou des ADN-méthylases qui présentent souvent des niveaux d'expression anormaux chez la cellule tumorale sont des voies actuellement étudiées. Ces enzymes possèdent des rôles de régulation dans la transcription de l'ADN (Minucci & Pelicci, 2006).

La méthylation de l'ADN sur le carbone en position 5 des cytosines par l'ADN méthyltransférase provoque l'inhibition de l'expression de nombreux gènes, incluant les gènes suppresseurs de tumeurs (Yang *et al.*, 2005).

De même, l'acétylation des histones conduit à l'expression des gènes alors que des histones déacétylés sont associés à des gènes inactifs. Dans les cancers, ce mécanisme est régulé par l'inactivation des histones acétyltransférases (HATs) ou par la surexpression des histones déacétylases (HDACs) (Dokmanovic & Marks, 2005).

Les différentes cibles thérapeutiques d'induction de l'apoptose sont présentées sur la figure 15.

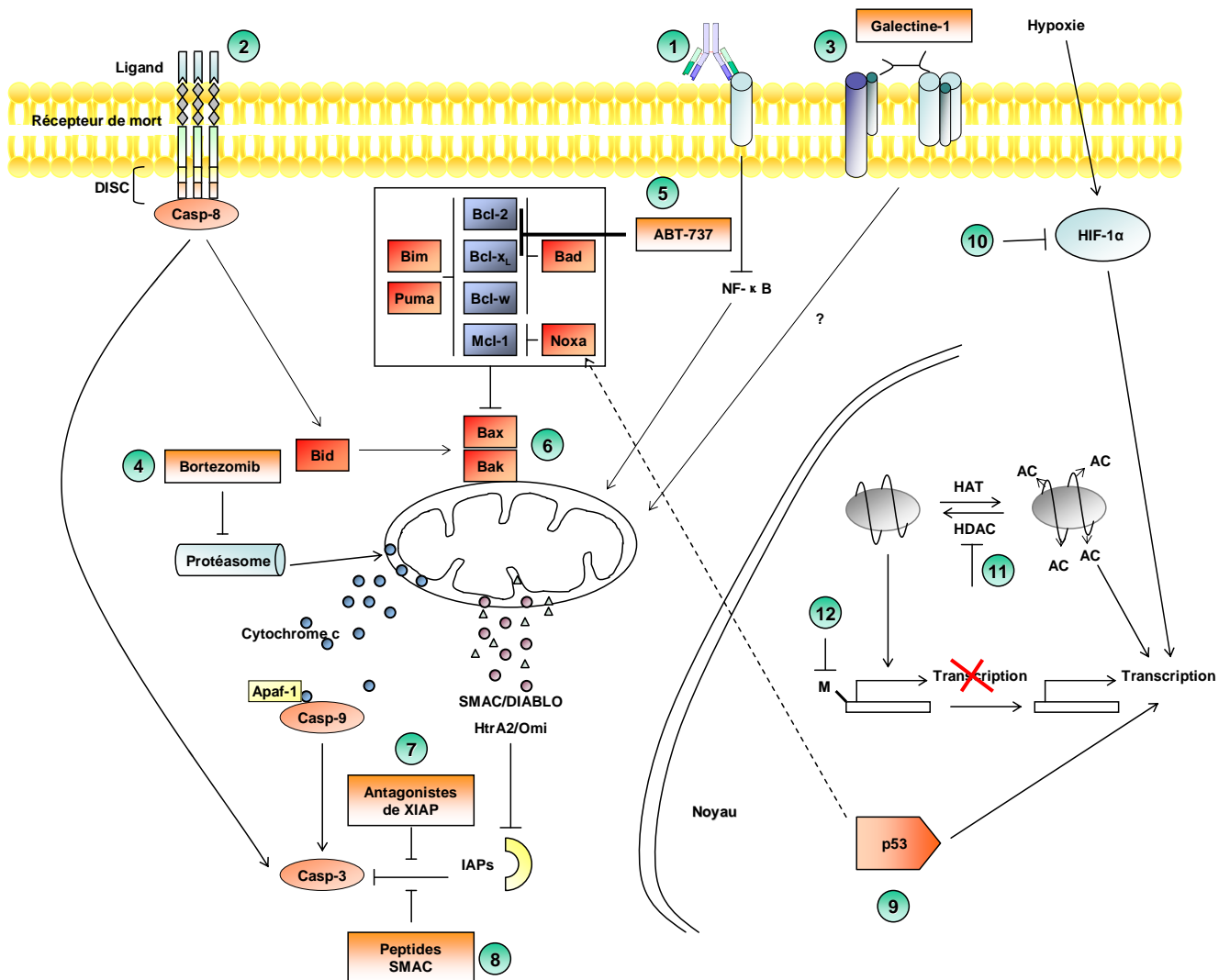


Figure 15: Voies thérapeutiques de l'apoptose: Avec en 1: utilisation d'anticorps monoclonaux. 2: voie des récepteurs de mort. 3: utilisation des galectines. 4: utilisation du bortezomibe comme inhibiteur du protéasome. 5: action de l'ABT-737 sur les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L. 6: induction de l'apoptose par action directe sur Bax/Bak. 7: inhibition de XIAP par des antagonistes. 8: inhibition de XIAP par des peptides issus de SMAC. 9: activation du gène p53. 10: inhibition de HIF-1α. 11: Inhibition des histones déacétylases. 12: Inhibition de l'ADN méthyltransférase. Avec HAT: histone acetyltransférases et HDAC: histone déacétylase (Bremer *et al.*, 2006; de Bruin & Medema, 2008)

2.3 IMPORTANCE DES PRODUITS NATURELS DANS LES TRAITEMENTS DU CANCER

Les produits naturels sont directement ou indirectement à l'origine de 60% des traitements anticancéreux. Des exemples comme la vincristine et le paclitaxel (issus de plantes) (Cf. figure 16), l'actinomycine D (Cf. figure 17), la mitomycine C (Cf. figure 8), la bléomycine (Cf. figure 18) (issues de sources microbiennes) ou encore la trabectedine et la bryostatine-1 (issus du monde marin) (Cf. figure 19) montrent l'importance des sources naturelles dans les traitements du cancer (Bailly, 2009).

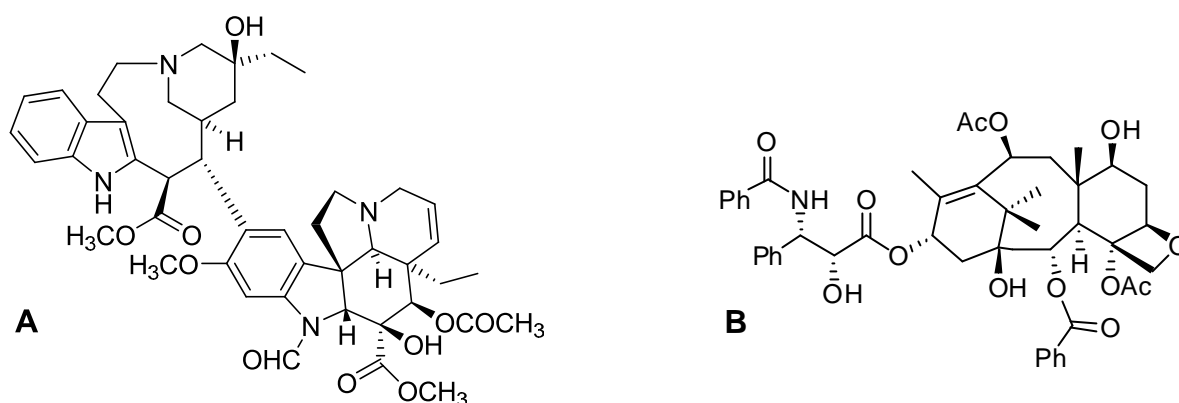


Figure 16 : Structure chimique de la vincristine (A) et du paclitaxel (B)

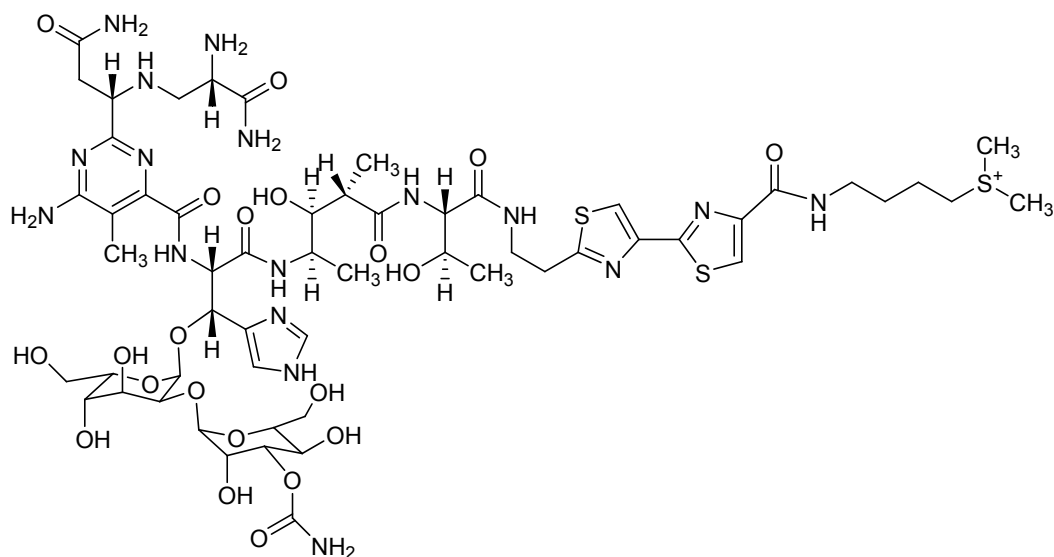


Figure 17 : Structure chimique de la bléomycine A₂

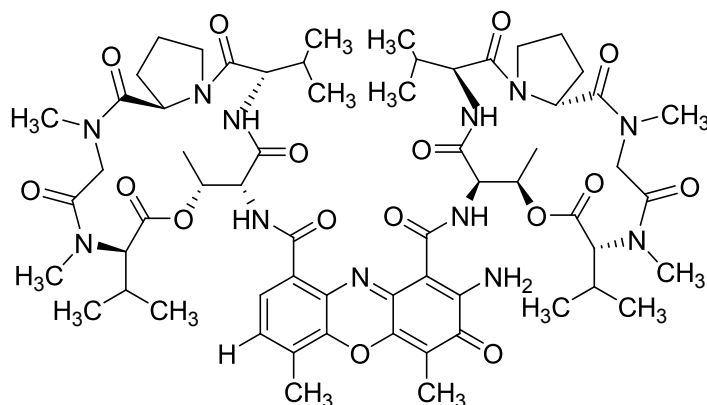


Figure 18 : Structure chimique de l'actinomycine D

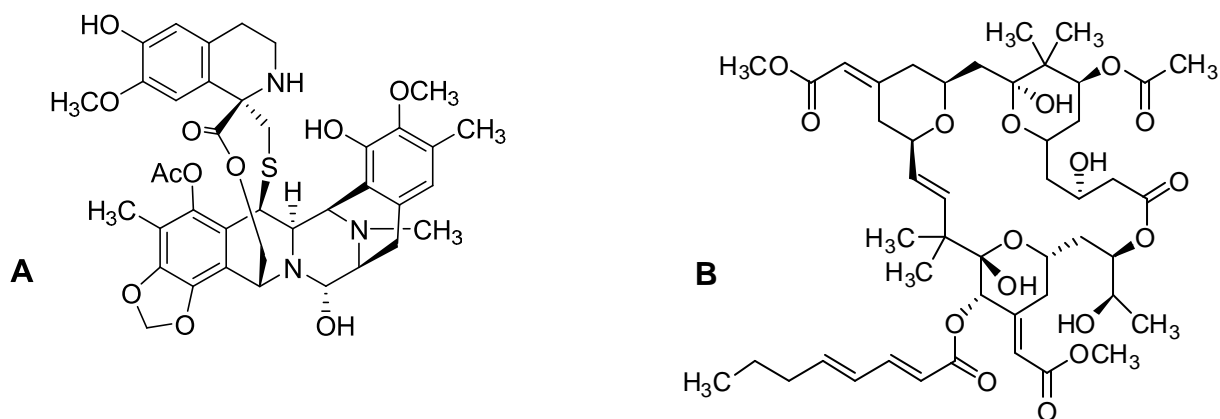


Figure 19 : Structure chimique de la trabectedine (A) et de la bryostatine-1 (B)

Le milieu naturel a toujours une grande importance dans ce secteur. Par exemple, l'épothilone (antibiotique de la classe des macrolides) synthétisé par *Sorangium cellulosum* a été découvert en 1995. L'épothilone montre une activité anticancéreuse *in vitro* importante sur les lignées cellulaires résistantes aux taxanes. Plus de 300 analogues de l'épothilone furent donc synthétisés conduisant à l'ixabépilone (Ixempra®) (Cf. figure 20) (Bailly, 2009).

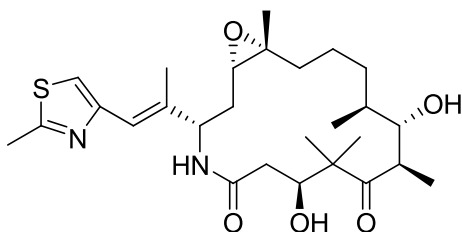


Figure 20 : Structure chimique de l'ixabépilone

Ce nouvel inhibiteur de microtubules possède le même mécanisme d'action que les taxanes, mais sans présenter de phénomènes de résistance. En octobre 2007, l'ixabépilone a reçu l'approbation de la FDA pour le traitement de cancer du sein métastatique ou localement avancé (Bailly, 2009).

Le temsirolimus (ou CCI-779, Torisel®) est le premier inhibiteur de protéine kinase mTOR (Mammalian target of rapamycin) approuvé par la FDA, en 2007, pour le traitement de patients avec un cancer rénal avancé. La voie de signalisation mTOR est impliquée dans les mécanismes de prolifération, de croissance, de survie cellulaire et d'angiogénèse. Il offre donc un nombre de possibilités importantes en association avec d'autres molécules thérapeutiques ciblées pour le traitement des tumeurs solides et des lymphômes. La classe des analogues de la rapamycine est connue depuis de nombreuses années, ce sont des antibiotiques de la classe des macrolides, produits par *Streptomyces hygroscopus* (Bailly, 2009; Nobili *et al.*, 2009). La structure chimique du temsirolimus est présentée sur la figure 21.

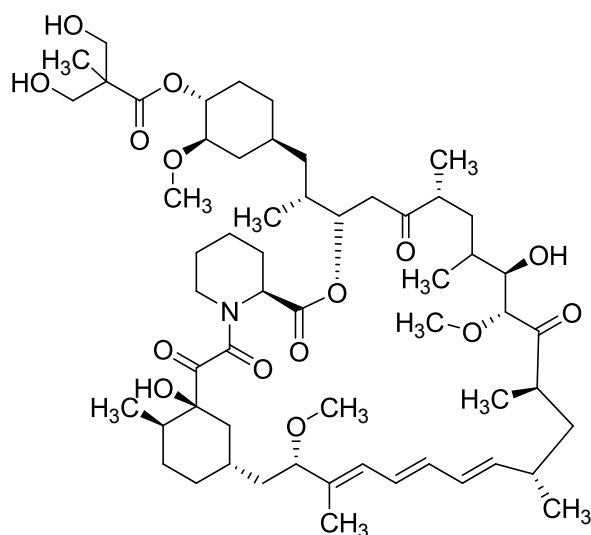


Figure 21 : Structure chimique du temsirolimus

Les exemples du temsirolimus et de l'ixabepilone montrent que les produits naturels sont une source importante pour la mise en évidence de nouvelles molécules anticancéreuses à actions ciblées.

2.3.1 Les sources d'anticancéreux

Les principales sources de molécules anticancéreuses sont les végétaux supérieurs, les bactéries et les moisissures. Dans les paragraphes suivants, sont présentées quelques molécules issues de ces différentes sources.

2.3.1.1 Les plantes

Durant les 40 dernières années, les plantes ont été la plus grande source de métabolites secondaires avec l'avantage de présenter une grande diversité chimique. Des médicaments tels que les camptothécines, les taxanes, les vinca-alcaloïdes et les épipodophyllotoxines sont toujours énormément prescrits (Cf. figure 22).

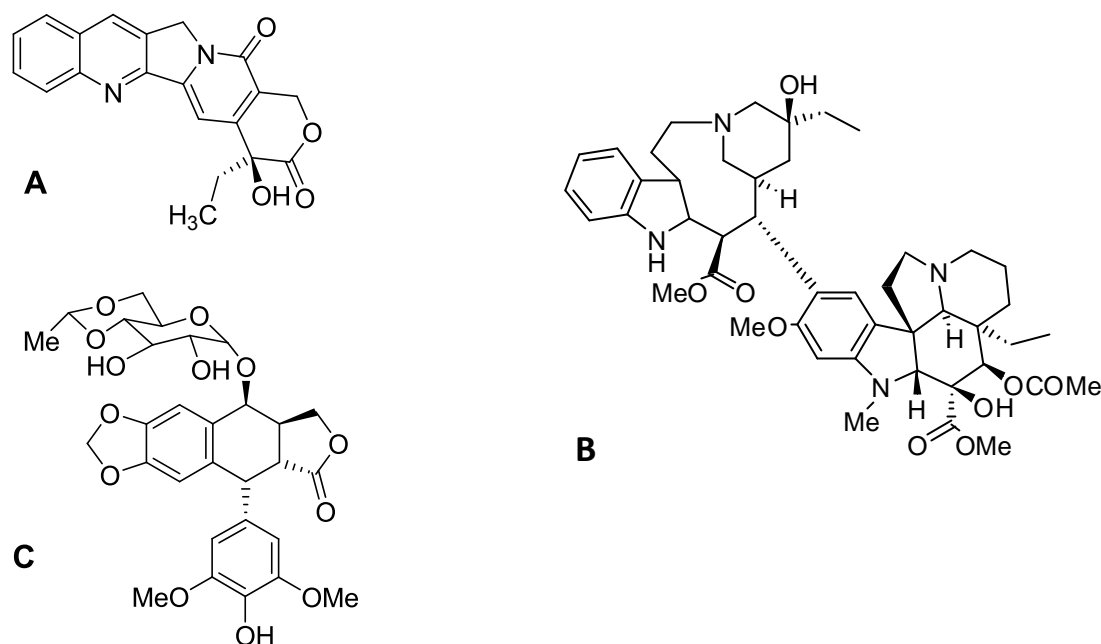


Figure 22 : Exemples de la diversité chimique du monde végétal terrestre ; formule chimique de la camptothécine (A), la vinblastine (B) et de l'étoposide 5 (épipodophyllotoxine) (C)

D'autres exemples de produits dérivés actuellement en cours d'investigation et d'essai clinique sont le flavopiridol, l'homoharringtonine, la β -lapachone, et la combrestatine A4 (Cf. figure 23). Le flavopiridol est un inhibiteur de Cdk. Cette molécule est une flavone synthétique dérivée de l'alcaloïde rohitukine, qui a été isolée des feuilles et des tiges de *Amoora rohituka* et plus tard de *Dysoxylum binectariferum* (Nobili *et al.*, 2009).

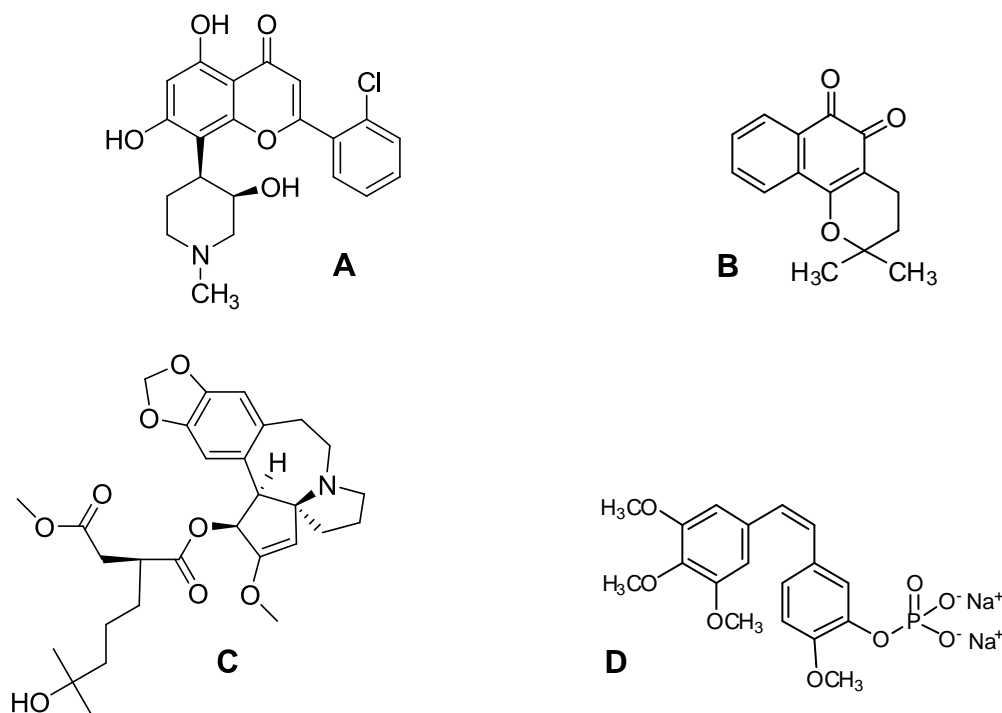


Figure 23 : Structure chimique du flavopiridol (A), de la β -lapachone (B), de l'homoharringtonine (C), et de la combrestatine A4 (D)

L'homoharringtonine est un alcaloïde isolé de l'arbre originaire de chine *Cephalotaxus harringtonia*. Il inhibe la synthèse des protéines et bloque la progression du cycle cellulaire.

La β -lapachone est une quinone obtenue de l'écorce de l'arbre *Tabebuia avellanadae*. C'est un inhibiteur de la topoisomérase I. Il induit un ralentissement du cycle en phase G₁ ou S avant d'induire l'apoptose ou la nécrose sur de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Nobili *et al.*, 2009).

La combrestatine A4 est isolée du tronc de l'arbre Sud-Africain *Combretum caffreum*, il inhibe la croissance des capillaires sanguins, causant la mort des cellules cancéreuses et leur nécrose (Nobili *et al.*, 2009).

Il est estimé que moins de 15% des plantes supérieures ont été étudiées pour la présence de composés bioactifs (Bailly, 2009). Le monde végétal donnera sans doute de nombreux autres composés anticancéreux.

2.3.1.2 Les microorganismes

La mise sur le marché de l'Ixempra® (Ixabepilone) (Cf. figure 20) et du Torisel® (temsirolimus) (Cf. figure 21) sont des exemples la richesse des microorganismes comme source de molécules anticancéreuses.

La romidepsine (FK228) isolée de la bactérie *Chromobacterium violaceum* est un depsipeptide inhibiteur des histones déacetylases. Il a montré des activités dans le traitement des patients souffrant de lymphome. La figure 24 représente la structure chimique de la romidepsine.

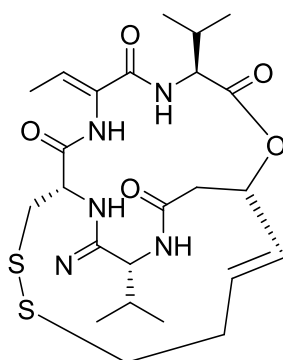


Figure 24 : Structure chimique de la romidepsine

Une proportion importante des composés bioactifs issus de sources animales est souvent synthétisée par un symbiote microbien (Dunlap *et al.*, 2007). Les microorganismes offrent l'avantage d'être cultivables en bioréacteur.

Ces 50 dernières années, les actinomycètes et les moisissures sont devenus les groupes les plus étudiés. A ce jour, il est estimé que le nombre d'antibiotiques caractérisés représente moins de 5% de la totalité. L'univers chimique produit par les microorganismes est encore largement inexploité (Bailly, 2009).

Ces prochaines années, le nombre de molécules anticancéreuses issues de microorganismes devrait s'accroître significativement avec le développement des méthodes de culture des organismes procaryotes et l'exploitation des approches de métagénomique pour les microorganismes non cultivables (Nobili *et al.*, 2009; Bailly, 2009).

SECTION 3: L'ENVIRONNEMENT MARIN, SOURCE DE MOLECULES NATURELLES ORIGINALES ET ACTIVES POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

1 BIODIVERSITE, CHIMIODIVERSITE ET PHARMACODIVERSITE DU MONDE MARIN

1.1 ORIGINE DE LA PHARMACODIVERSITE DU MONDE MARIN

Le milieu marin a été très longtemps inexploré du point de vue pharmacologique. Les océans couvrent 70% de la surface de notre planète (Haefner, 2003) et représentent le plus grand écosystème mais aussi le plus ancien. Il apparaît aujourd'hui comme une source très importante de nouvelles molécules tête de série. Le monde marin est reconnu comme la source de molécules à activité biologique présentant le plus grand potentiel.

Les substances naturelles isolées d'organismes marins se caractérisent souvent par la présence d'éléments chimiques ou de structures rarement observées en milieu terrestre en raison de la composition chimique de l'eau de mer. Les molécules marines contiennent des atomes comme le chlore, le soufre, le brome, le bore, le silicium, l'iode et l'arsenic. Ces éléments sont peu retrouvés dans les métabolites des organismes terrestres (Kornprobst, 2005).

Outre cette originalité chimique, les molécules marines présentent également une originalité structurale. Par exemple, les terpènes halogénés retrouvés chez certaines algues rouges (Cf. figure 25) n'ont pas d'équivalents terrestres (Kornprobst, 2005).

Enfin, les molécules isolées ont souvent des mécanismes d'action particuliers et peu retrouvés chez les autres molécules anticancéreuses (Nobili *et al.*, 2009; von Schwarzenberg & Vollmar, 2010). Par exemple, la céphalostatine 1 induit l'apoptose *via* l'activation des caspases (Cf. figure 26). Le salinosporamide A (Cf. figure 26) est un inhibiteur du protéasome. Les particularités des molécules marines du point de vue structural mais aussi au niveau de leur mécanisme d'action constituent un avantage dans la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses (von Schwarzenberg & Vollmar, 2010).

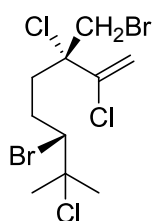


Figure 25 : Structure chimique de l'halomon issu de l'algue rouge *Portiera hornemannii*. Cette molécule possède une forte action cytotoxique sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (Kornprobst, 2005).

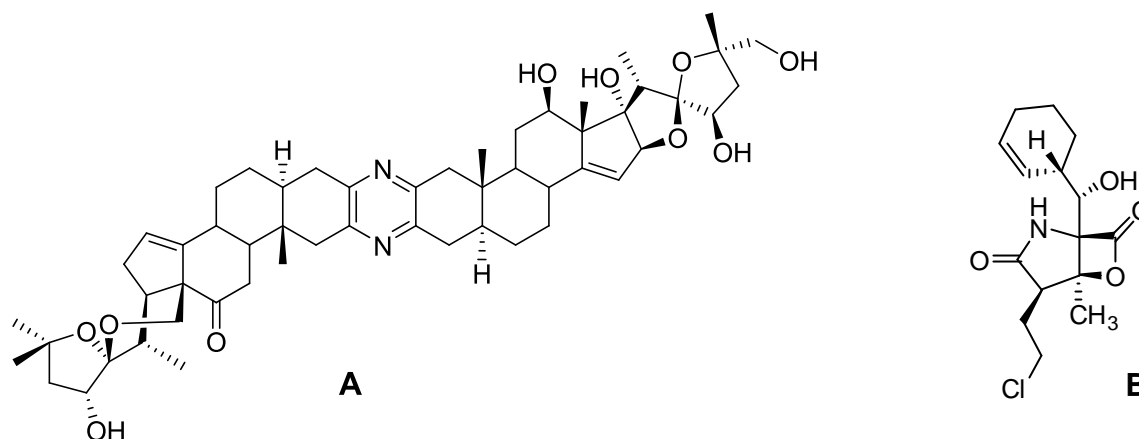


Figure 26 : Structure chimique de la céphalostatine 1 (A) et du salinosporamide A (B)

En 2004, 716 nouveaux composés d'origine marine à activité biologique étaient référencés, 812 en 2005, et 719 en 2006 (Glaser & Mayer, 2009; Nobili *et al.*, 2009). Un nombre croissant de composés sont actuellement en phase pré-clinique ou clinique de développement pharmaceutique.

1.2 LES PREMIERES DECOUVERTES EN PHARMACOLOGIE MARINE

Même si l'utilisation des algues marines apparaît dans la pharmacopée chinoise (2800 ans avant J-C), l'utilisation d'organismes marins dans les médecines traditionnelles reste très limitée et les recherches en pharmacologie marine ont débuté au milieu du XX^{ème} siècle, avec deux découvertes majeures.

1 : En 1948, les céphalosporines (Cf. figure 27) sont isolées par le professeur Brotzu d'un champignon microscopique marin (*Cephalosporium acremonium*). Les céphalosporines sont des antibiotiques encore couramment utilisées (Kornprobst, 2005).

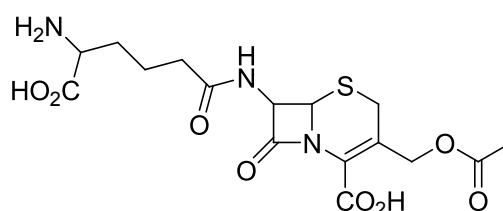


Figure 27 : Structure chimique de la céphalosporine C

2 : Au début des années 50, les arabinosides sont isolés par le chimiste américain Bergmann à partir d'une éponge des caraïbes *Cryptotethya crypta*. L'ARA-C est un anticancéreux puissant (Kornprobst, 2005; Newman *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2010). Leurs analogues de synthèse sont l'ARA-A et l'ARA-C. La structure chimique de l'ARA-C est présentée sur la figure 28.

Suite à ces deux découvertes, des efforts considérables furent mis en œuvre pour découvrir des nouveaux produits naturels provenant des océans.

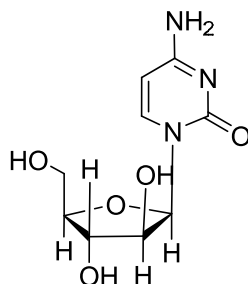


Figure 28 : Structure chimique de l'ARA C

Le ziconotide (Prialt®), issu du venin de *Conus magus* (Cf. figure 29) a été autorisé en 2004 pour le traitement de la douleur (Mayer *et al.*, 2010; Olivera, 2000). La trabectedine (Yondélis®) est une molécule anticancéreuse qui a été approuvée en 2007 (Glaser & Mayer, 2009; Mayer *et al.*, 2010). Ces deux médicaments, issus du monde marin, sont les premiers autorisés depuis une quarantaine d'année. De nombreuses autres molécules d'origine marine sont en phase de développement clinique.

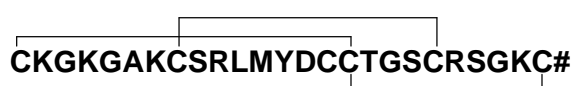
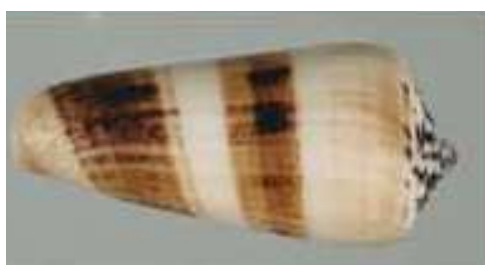


Figure 29 : Structure chimique du ziconotide (Prialt®) et photographie de *Conus magus*¹

¹ photographie de *conus magus* de Kerry Matz et fourni par B. M. Olivera (University of Utah, Salt Lake City, UT, USA) (Mayer *et al.*, 2010).

En 1998, 35 nouvelles molécules anticancéreuses issues du monde marin étaient identifiées et caractérisées. En 2008, 136 produits naturels d'origine marine et appartenant à des classes structurales diverses, incluant des polykétides, des terpènes, des stéroïdes et des peptides sont référencés (Cf. tableau 2), (Glaser & Mayer, 2009). Ces molécules proviennent de diverses sources comprenant les invertébrés, les bactéries et les moisissures. Le travail de recueil de données bibliographiques effectué par Mayer illustre les potentialités immenses qu'offre le monde marin en cancérologie.

Tableau 2 : Molécules marines anticancéreuses identifiées et caractérisées entre 1998 et 2006 (Glaser & Mayer, 2009).

Année	Produits naturels marins en phase d'essai clinique ou préclinique en oncologie
2006	136
2004	150
2002	97
2000	143
1999	31
1998	35
Total	592

1.3 ANTICANCEREUX ISOLES A PARTIR D'ORGANISMES MARINS

Le tableau 3 présente les différents anticancéreux d'origine marine approuvés ou en cours de développement clinique.

Tableau 3 : Les différents anticancéreux actuellement sur le marché ou en phase d'essai clinique (Mayer *et al.*, 2010)

Statut clinique	Nom du composé	Nom commercial	Origine	Classe chimique
Approuvé en 1969	Cytarabine, ARA-C	Cytosar-U®	Eponge	Nucleoside
	Trabectedine (ET-743)	Yondelis®	Tunicier	Alcaloïde
Phase III	Eribulin Mesylate(E7389)		Eponge	Macrolide
	Soblidotine (TZT1027)		Bactérie	Peptide
Phase II	Plinabuline (NPI2358)		Fungus	Diketopiperazine
	Plitidepsine	Aplidin®	Tunicier	depsipeptide
	PM1004	Zalypsis®	Nudibranche	Alcaloïde
Phase I	Tasidotine, Synthadotine (ILX651)		Bactérie	Peptide
	Bryostatine 1		Bryozoaire	Polyketide
	Hemiasterline (E7974)		Eponge	Tripeptide
	Marimozide (Salinosporamide A, NPI-0052)		Bactérie	Béta-lactone-gammalactam

Dans le paragraphe suivant sont référencées et présentées les principales molécules anti-tumorales d'origine marine ayant atteint les essais cliniques ou actuellement sur le marché.

1.3.1 Molécules cytotoxiques

La trabectedine (Ecteinascidin-743, Yondelis®) est un alcaloïde de la classe des tétrahydroisoquinolines provenant de l'ascidie *Ecteinascidia turbinata* (Wright *et al.*, 1990). Elle est maintenant produite par hémi-synthèse à partir de la cyanosafracine B extraite après fermentation de la bactérie marine *Pseudomonas fluorescens* (Cuevas & Francesch, 2009).

La trabectedine est un agent alkylant spécifique des positions N₂ des guanines du petit sillon de l'ADN agissant sur la machinerie de réparation de l'ADN. L'alkylation conduit à une courbure de l'ADN qui affecte différents facteurs de transcriptions impliqués dans la prolifération cellulaire, particulièrement concernant le système de réparation couplé à la transcription par excision des nucléotides (Herrero *et al.*, 2006; Takebayashi *et al.*, 2001; Zewail-Foote & Hurley, 2001; Bailly, 2009). L'effet antiprolifératif dû à la liaison avec l'ADN intervient pour de faibles concentrations (1 à 10 ng.ml⁻¹). Pour des doses plus importantes (10-100 ng.ml⁻¹), il y a activation de l'apoptose par relargage de cytochrome c et activation de la caspase -3 (Gajate *et al.*, 2002; von Schwarzenberg & Vollmar, 2010). La structure chimique de la trabectedine est représentée sur la figure 30.

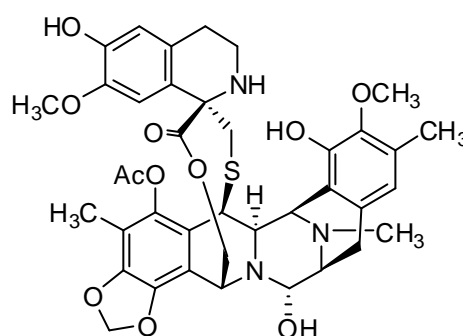


Figure 30 : Structure chimique de la trabectedine et photographie de *Ecteinascidia turbinata*¹

Les molécules de la famille des hemiasterlines (tripeptides), issues d'éponges du genre *Auletta* (Talpir *et al.*, 1994), telle que le E7974 et la taltobuline (HTI286) (analogues de synthèse) se lient au site de liaison des vinca-alcaloïdes de la tubuline, provoquant l'inhibition de la polymérisation de la tubuline ainsi que la dépolymérisation des microtubules existants, l'inhibition de la mitose et donc de la prolifération cellulaire (Kuznetsov *et al.*, 2009; Simmons *et al.*, 2005). Le E7974 est représenté sur la figure 31.

¹ photographie de *Ecteinascidia turbinata* de PharmaMar, Inc., Madrid, Espagne (Mayer *et al.*, 2010).

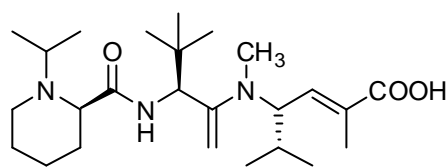


Figure 31 : Structure chimique de E7974 et photographie de *Hemiasterella minor*¹

Le kahalalide F (Cf. figure 32) a été isolé du mollusque *Elysia rufescens*. C'est un tridecapeptide. La source originelle de cette molécule est l'algue *Bryopsis spp*, qui fait partie du régime alimentaire de *E .rufescens* (Hamann *et al.*, 1996; Hamann & Scheuer, 1993; López-Macià *et al.*, 2001). Le kahalalide F est cytotoxique sur de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et provoquerait leur nécrose, par contre les marqueurs de l'apoptose ne sont pas activés (von Schwarzenberg & Vollmar, 2010). Son mécanisme d'action est encore mal connu. L'elisidepsine (PM02734, Irvalec®) est un dérivé du kahalalide F qui est en cours d'essai clinique (Ling *et al.*, 2009).

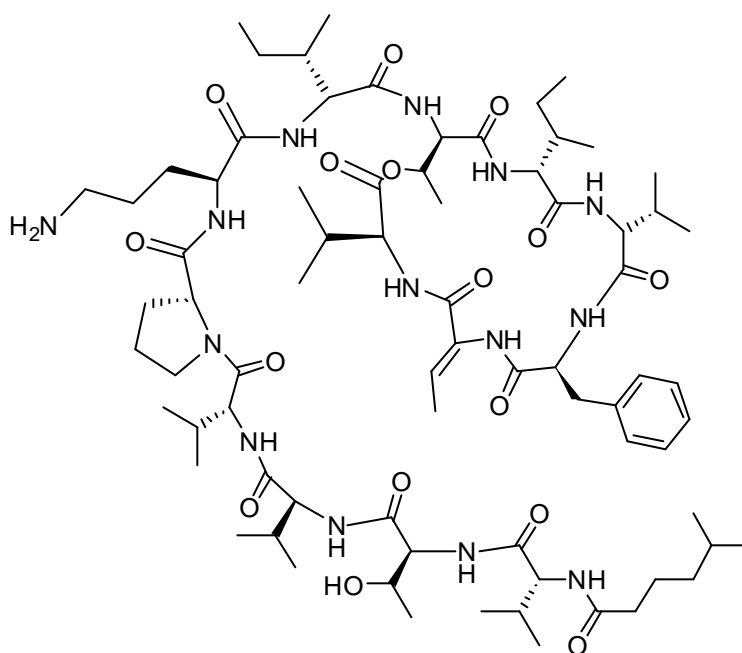


Figure 32 : Structure chimique du kahalalide F et photographie de *Elysia rufescens*²

¹ photographie de *hemiasterella minor* reproduite de Y. Benayahu et S. Perkol-Finkel (Mayer *et al.*, 2010).

² photographie de *Elysia rufescens* de PharmaMar, Inc., Madrid, Espagne (Mayer *et al.*, 2010).

Les dolastatines ont été isolées initialement du mollusque *Dolabella auricularia* (Pettit *et al.*, 1981). En réalité, elles proviennent des cyanobactéries du genre *Symploca* qui font partie du régime alimentaire de *D. auricularia*. Les dolastatines sont des oligopeptides (pentapeptides), contenant des acides aminés aconventionnels (dolavaline, dolaisoleucine, dolaproline, dolaphinine). Les dolastatines 10 et 15 montrent une activité cytotoxique. La dolastatine 15 agit en se fixant au site de liaison des vinca-alcaloïdes de la tubuline et inhibent la polymérisation des microtubules, alors que la dolastatine 10 se lie au site de liaison des rhizoxine et maytansine adjacent du site de liaison des vinca-alcaloïdes (Bai *et al.*, 1993; Mitra & Sept, 2004; Simmons *et al.*, 2005). La dolastatine 15 n'a pas franchi l'étape des essais cliniques en raison de faibles rendements de synthèse chimique, mais aussi à cause d'une faible solubilité en milieu aqueux. Cependant la synthadotine ou tasidotine (ILX651), dérivée de la dolastatine 15, est en cours d'essais cliniques (Simmons *et al.*, 2005).

La dolastatine 10 (Cf. figure 33) montre une activité pro-apoptotique sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (sein, poumon, leucémie et lymphome) (Kalemkerian *et al.*, 1999). Elle agit en augmentant l'expression de Bax et en diminuant celle des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Kalemkerian *et al.*, 1999; Wall *et al.*, 1999). La dolastatine 10 n'a pas franchi l'étape des essais cliniques, car 40% des patients traités avec cette molécule présentent une neuropathie (Banerjee *et al.*, 2008). Cependant, un de ses dérivés de synthèse la soblidotine (TZT1027), soluble en milieu aqueux, est en cours d'évaluation clinique (Kobayashi *et al.*, 1997; Banerjee *et al.*, 2008; von Schwarzenberg & Vollmar, 2010).

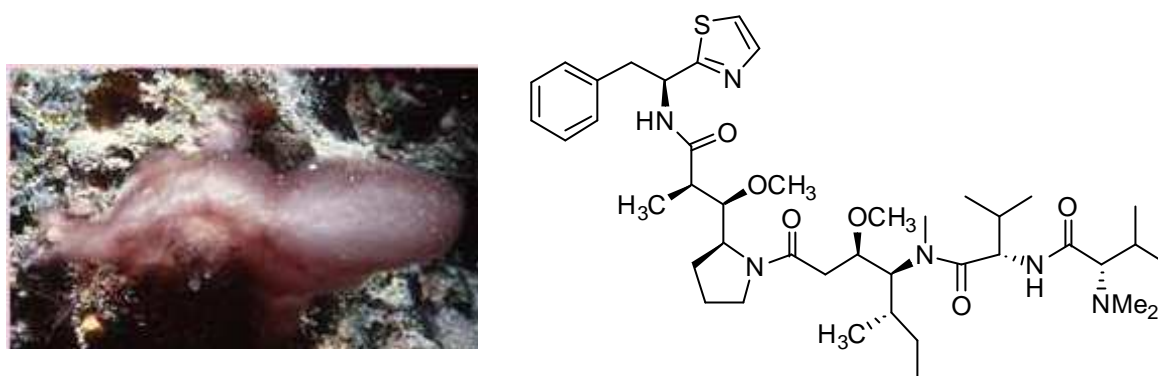


Figure 33 : Structure chimique de la dolastatine 10 et photographie de *Symploca sp.*¹

¹ photographie de *Symploca sp.* de Raphael Ritson-Williams (Smithsonian Institute, Ft. Pierce, FL, USA) (Mayer *et al.*, 2010).

L'halichondrine B appartient à la famille des macrolides, elle a été isolée à partir de l'éponge *Halichondria okadai* (Jackson *et al.*, 2009). L'halichondrine B se fixe à la tubuline *via* le site des Vinca-alcaloïdes et empêche la dépolymérisation des microtubules (Jordan *et al.*, 2005; Okouneva *et al.*, 2008). L'éribuline mésylate E7389 (Cf. figure 34) actuellement en cours d'essai clinique est l'un de ces dérivés (Mayer *et al.*, 2010).

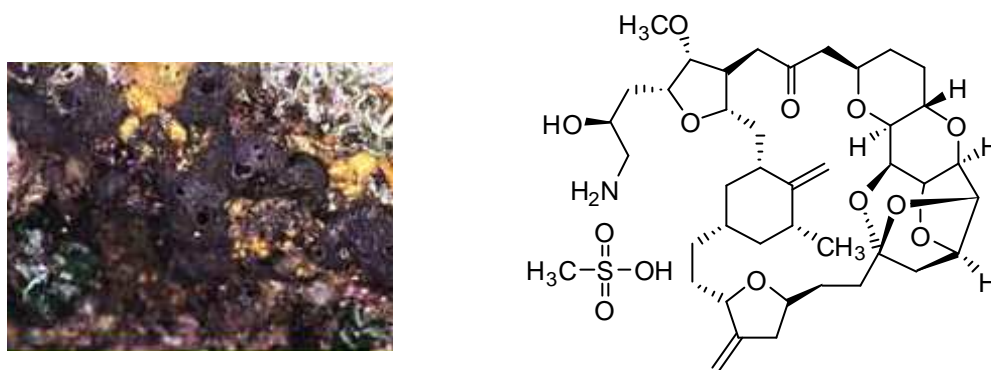


Figure 34 : Structure chimique de l'éribuline mésylate et photographie de *Halichondria okadai*¹

La spisulosine (ES-285) extraite du bivalve *Spisula polynyma*, agit en déstabilisant les filaments d'actine du cytosquelette des cellules cancéreuses. Les cellules traitées avec cette molécule présentent une morphologie particulière (Cuadros *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2008). Son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé. La structure chimique de la spisulosine est présentée sur la figure 35.



Figure 35: Structure chimique de la spisulosine et photographie de *Spisula polynyma*²

¹ photographie de *Halichondria okadai* du Professor Yasunori Saito (Mayer *et al.*, 2010).

² photographie de *Spisula polynyma* : <http://marinebiotech.org>

Le Zalypsis® (PM00104) (Cf. figure 36) est un alcaloïde synthétique inspiré par la jorumycine et des molécules de la famille des renieramycines issues respectivement de mollusques et d'éponges (Scott & Williams, 2002). Il présente une activité antinéoplasique. Il se lie de manière réversible à l'ADN et interfère dans les processus de réplication, de transcription et de traduction (Leal *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2010).

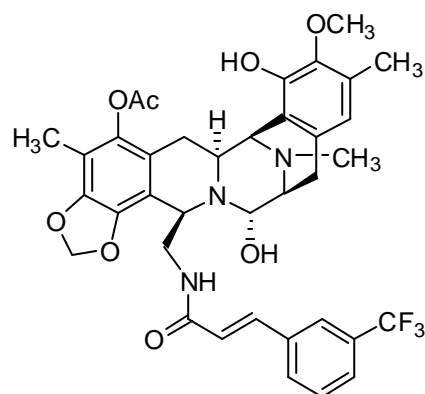


Figure 36 : Structure chimique du Zalypsis® et photographie de *Joruna funebris*¹

Le plinabuline NPI-2358 (Cf. figure 37) est un dérivé synthétique d'halimide issu de *Aspergillus sp.* CNC-139 cultivé à partir de l'algue verte *Halimeda lacrimosa*, il présente une activité antinéoplasique (Kanoh *et al.*, 1997; Mayer *et al.*, 2010). Il se lie sélectivement au site de liaison des colchicines de la tubuline, provoquant un arrêt du cycle cellulaire en phase M et un blocage de la division cellulaire (Nicholson *et al.*, 2006; Yamazaki *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2010). Il induit également la dépolymérisation de la tubuline des cellules endothéliales vasculaires, et détruit sélectivement la vascularisation de la tumeur (Nicholson *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2010).

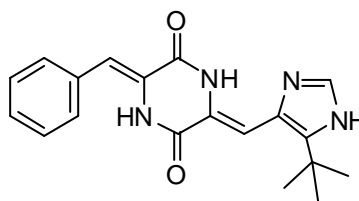


Figure 37 : Structure chimique du NPI-2358 et photographie de *Aspergillus sp.* CNC-139²

¹ photographie de *Joruna funebris* de PharmaMar, Inc., Madrid, Espagne (Mayer *et al.*, 2010).

² photographie de Paul Jensen (University of California, San Diego, CA, USA) (Mayer *et al.*, 2010).

1.3.2 Activateur du système immunitaire

Le KRN 7000 est un dérivé d'agelasphines, c'est un α -galactosylcéramide, issu de l'éponge *Agelas mauritanus* (Natori *et al.*, 1994). Il active la réponse immunitaire et stimule la production de lymphocyte T tueur (ou NKT). Il présente également des activités anti-métastatiques (Yang *et al.*, 2004; Simmons *et al.*, 2005). La structure chimique du KRN7000 est présentée sur la figure 38.

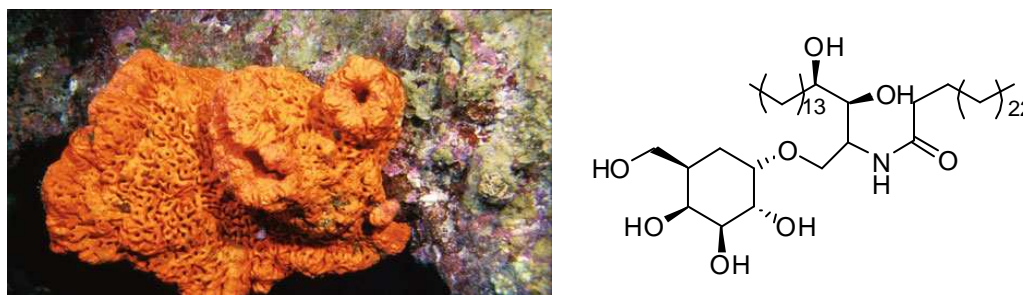


Figure 38 : Structure chimique du KRN 7000 et photographie d'*Agelas clathroides*¹

1.3.3 Molécules inhibant l'angiogénèse

La squalamine est issu de l'estomac du requin *Squalus acanthias* (Moore *et al.*, 1993) (Cf. figure 39). Elle inhibe l'angiogénèse en empêchant la liaison du VEGF à son récepteur ce qui inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Li *et al.*, 2002).

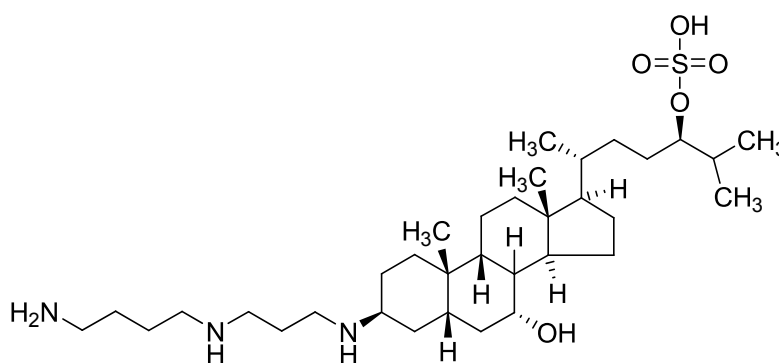


Figure 39 : Structure chimique de la squalamine

¹ photographie d'*Agelas clathroides*: <http://marinebiotech.org>

1.3.4 Molécules intervenant dans les voies de signalisation cellulaire et le cycle cellulaire

Le panobinostat (LBH 589) inspiré de la psammapline (issue de l'éponge : *Psammaplysilla spp*) présente une activité antinéoplasique. Il inhibe sélectivement les histones déacétylases ce qui conduit à l'hyperacétylation des histones et provoque une modulation de l'expression des protéines du cycle cellulaire, l'arrêt du cycle en phase G₂/M et l'apoptose. Cette molécule module également l'expression des gènes impliqués dans l'angiogénèse, comme les facteur HIF-1 et le VEGF (Sashidhara *et al.*, 2009; Simmons *et al.*, 2005). La structure chimique de panabinostat est présentée sur la figure 40.

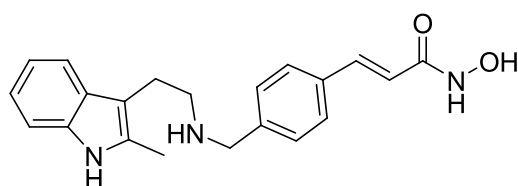


Figure 40 : Structure chimique du panobinostat

Le salinosporamide A (NPI0052) (Cf. figure 41) est issu de l'actinomycète *Salinospora tropica* (Feling *et al.*, 2003; Fenical *et al.*, 2009). Elle présente une activité antinéoplasique. Le salinosporamide A inhibe de manière irréversible le protéasome et il induit l'apoptose chez les cellules résistantes au bortezomibe (inhibiteur du protéasome). L'inhibition du protéasome conduit à l'accumulation de protéines poly-ubiquitinisées, provoquant l'arrêt des processus cellulaires, du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, l'inhibition de la croissance cellulaire et de l'angiogénèse (Chauhan *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 2010; von Schwarzenberg & Vollmar, 2010).

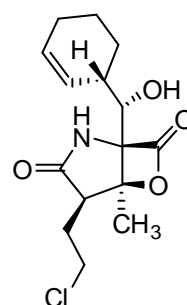


Figure 41 : Structure chimique du salinosporamide A et photographie de *salinospora tropica*¹

¹ : photographie de *salinospora tropica* de Sy Teisan (Nereus Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, USA) (Mayer *et al.*, 2010).

Les bryostatines sont des lactones macrocycliques originellement isolées du bryzoaire *Bugula neritina* (Pettit *et al.*, 1982). Il existe de nombreux dérivés synthétiques de la bryostatine-1. Jusqu'à présent, la synthèse complète de la bryostatine-1 (Cf. figure 42) reste difficile (Mayer *et al.*, 2010). Les bryostatines se lient et inhibent la protéine kinase C (PKC), conduisant à l'inhibition de la prolifération cellulaire et à l'induction de l'apoptose chez les cellules cancéreuses. La bryostatine-1 inactive la protéine Bcl-2 anti-apoptotique. Son effet pro-apoptotique est faible lorsqu'elle est utilisée seule. Par contre, utilisée en combinaison avec le paclitaxel, elle montre une augmentation de l'activation des caspases, y compris chez les cellules cancéreuses présentant une surexpression de la protéine Bcl-xl (Wender *et al.*, 1988; von Schwarzenberg & Vollmar, 2010; Isakov *et al.*, 1993; Kortmansky & Schwartz, 2003; Banerjee *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2010). La structure chimique de la bryostatine 1 est présentée sur la figure 42.

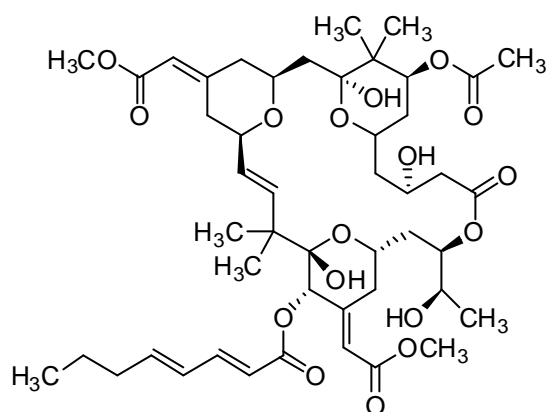


Figure 42 : Structure chimique de la Bryostatine 1 et photographie de *Bugula neritina*¹

¹ photographie de *Bugula neritina* de Koty Sharp, (Ocean Genome Legacy, Ipswich, MA, USA) (Mayer *et al.*, 2010).

1.3.5 Inducteurs d'apoptose

La plitidepsine (aplidine®) analogue de la déhydrodidemnine B est un depsipeptide cyclique isolé d'*Aplidium albicans* (tunicien). Il induit l'apoptose en déclenchant le relargage de cytochrome c et active la caspase-3. Il provoque également l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ et G₂, ce qui inhibe la prolifération cellulaire. La déhydrodidemnine B est représentée sur la figure 43 (Cuadrado *et al.*, 2003; García-Fernández *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2005).

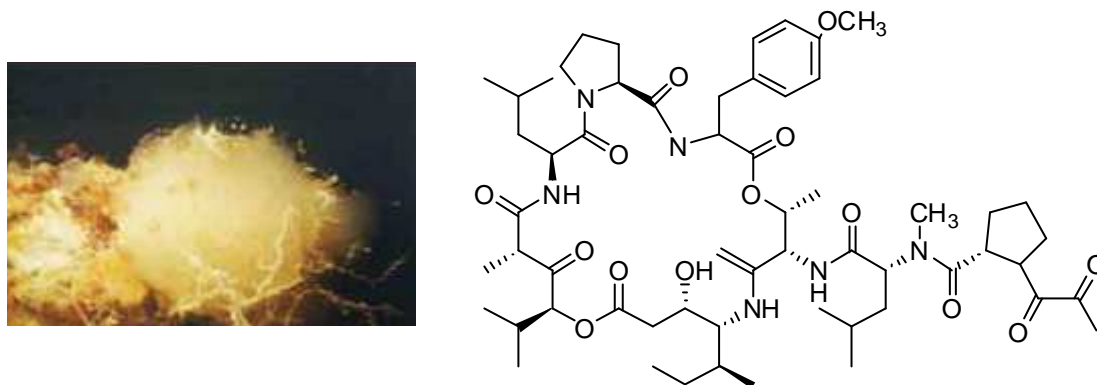


Figure 43 : Structure chimique de la déhydrodidemnine B et photographie de *Aplidium albicans*¹

De nombreuses molécules issues du monde marin présentant des activités anticancéreuses n'ont pas franchi toutes les étapes des essais cliniques.

Par exemple, le discodermolide (Cf. figure 44) est sorti des essais cliniques en phase I, en 2000. Cette molécule est produite par l'éponge *Discodermia dissolute* (De Souza, 2004). Il agit comme un immunosuppresseur et induit l'arrêt du cycle cellulaire en G₂/M et l'apoptose sur de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses. Il se lie à la tubuline et stabilise les microtubules avec d'autres agents stabilisants des microtubules comme le paclitaxel.

¹ photographie de *Aplidium albicans* de PharmaMar, Inc., Madrid, Espagne (Mayer *et al.*, 2010).

Outre la stabilisation des microtubules, le discodermolide induit l'activation tardive des caspases-3 et -8, mais aussi le relargage de cytochrome c, provoquant l'apoptose. Cette molécule montre toujours un intérêt, notamment en association avec d'autres traitements, notamment avec le paclitaxel (synergie) (Martello *et al.*, 2000; Longley *et al.*, 1993; Hung *et al.*, 1996; von Schwarzenberg & Vollmar, 2010).

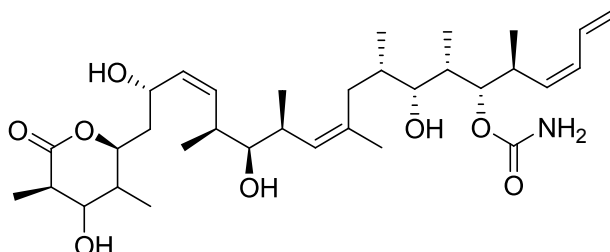


Figure 44 : Structure chimique du discodermolide

1.4 MOLECULES MARINES ET MECANISMES D'ACTION

Les différentes molécules présentées ici montrent une grande variété d'effets anticancéreux. Nombreuses sont celles qui induisent l'apoptose, comme la trabectedine, la dolastatine 10 et ses dérivés, la salinosporamide A, la bryostatine-1, la déhydrodidemnine B et le discodermolide. D'autres agissent sur le cycle cellulaire comme le panobinostat. La spisulosine (ES-285) agit sur le cytosquelette et le KRN 7000 stimule le système immunitaire. La squalamine est un inhibiteur de l'angiogénèse.

Toutes ces différentes molécules et mécanismes d'action montrent le potentiel des molécules marines en cancérologie et notamment dans le cadre des thérapies ciblées.

2 LES MACROALGUES ET MICROALGUES MARINES : UN VIVIER PEU EXPLORÉ DE MOLECULES ANTICANCEREUSES

2.1 BIODIVERSITE ET ORIGINALITE DES MACROALGUES ET MICROALGUES MARINES

Dans ce mémoire, la plupart des informations sur la classification des algues et leurs caractéristiques proviennent de l'ouvrage de Bruno de Reviers intitulé « Biologie et phylogénie des algues ».

2.1.1 Définition des algues

Les algues peuvent être définies comme des organismes inféodés aux zones humides, le plus souvent photosynthétiques. Les algues incluent les macroalgues benthiques, marines ou d'eau douce, et un ensemble d'organismes microscopiques marins ou d'eau douce, planctoniques, benthiques, qualifiés de microalgues (de Reviers, tome 1)¹.

2.1.2 Origine des différentes classes d'algues

La biologie moderne montre que les cellules eucaryotes sont formées de composants d'origine différente, hérités de divers groupes de procaryotes comme les mitochondries. Les eucaryotes photosynthétiques possèdent un niveau d'organisation supplémentaire par rapport aux autres cellules eucaryotes. L'organite dans lequel est effectuée la photosynthèse, le chloroplaste, est d'origine procaryote. Il dérive d'une cyanobactérie symbiotique devenue un élément constitutif de la cellule eucaryote photosynthétique. Cet événement est appelé l'endosymbiose primaire. Un unique événement d'endosymbiose primaire est à l'origine des chloroplastes des glaucophytes, des rhodophytes et des chlorobiontes. La figure 45 représente le diagramme synthétique de la phylogénie des chloroplastes endosymbiotiques primaires basé sur le résultat de l'analyse des séquences génétiques (de Reviers, tome 1).

¹ de Reviers, B. (2002) *Biologie et phylogénie des algues*. Belin.

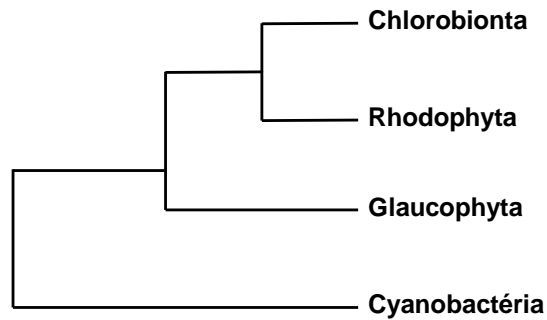


Figure 45 : Diagramme synthétique de la phylogénie des chloroplastes endosymbiotiques primaires basé sur le résultat de l'analyse des séquences génétiques (de Reviers, tome 1)

Chez certains eucaryotes photosynthétiques, cet imbriquement d'organismes est encore plus complexe. Il y a emboîtement d'une cellule eucaryote contenant un chloroplaste d'origine cyanobactérienne dans une seconde cellule eucaryotique. Il s'agit de l'endosymbiose secondaire ou tertiaire (de Reviers, tome 1).

Par exemple, les chloroplastes des euglénophycées dérivent d'une algue verte endosymbiotique appartenant aux chlorophytes, de même pour les chlorarachniophycées (de Reviers, tome 1).

Les chloroplastes des cryptophytes, des haptophytes et des ochrophytes (hétérokontes) dérivent d'une algue rouge, *via* trois événements séparés d'endosymbiose. Le chloroplaste à péridinine des dinophytes semble dériver d'une algue rouge par endosymbiose secondaire.

D'autres endosymbioses, secondaire avec des algues vertes appartenant aux Prasinophyceae ou tertiaire avec des diatomées (ochrophytes) ou des haptophytes, existent aussi chez les dinophytes (de Reviers, tome 1).

La figure 46 représente le diagramme synthétique de la phylogénie des chloroplastes endosymbiotiques secondaire et tertiaire. (de Reviers, tome 1).

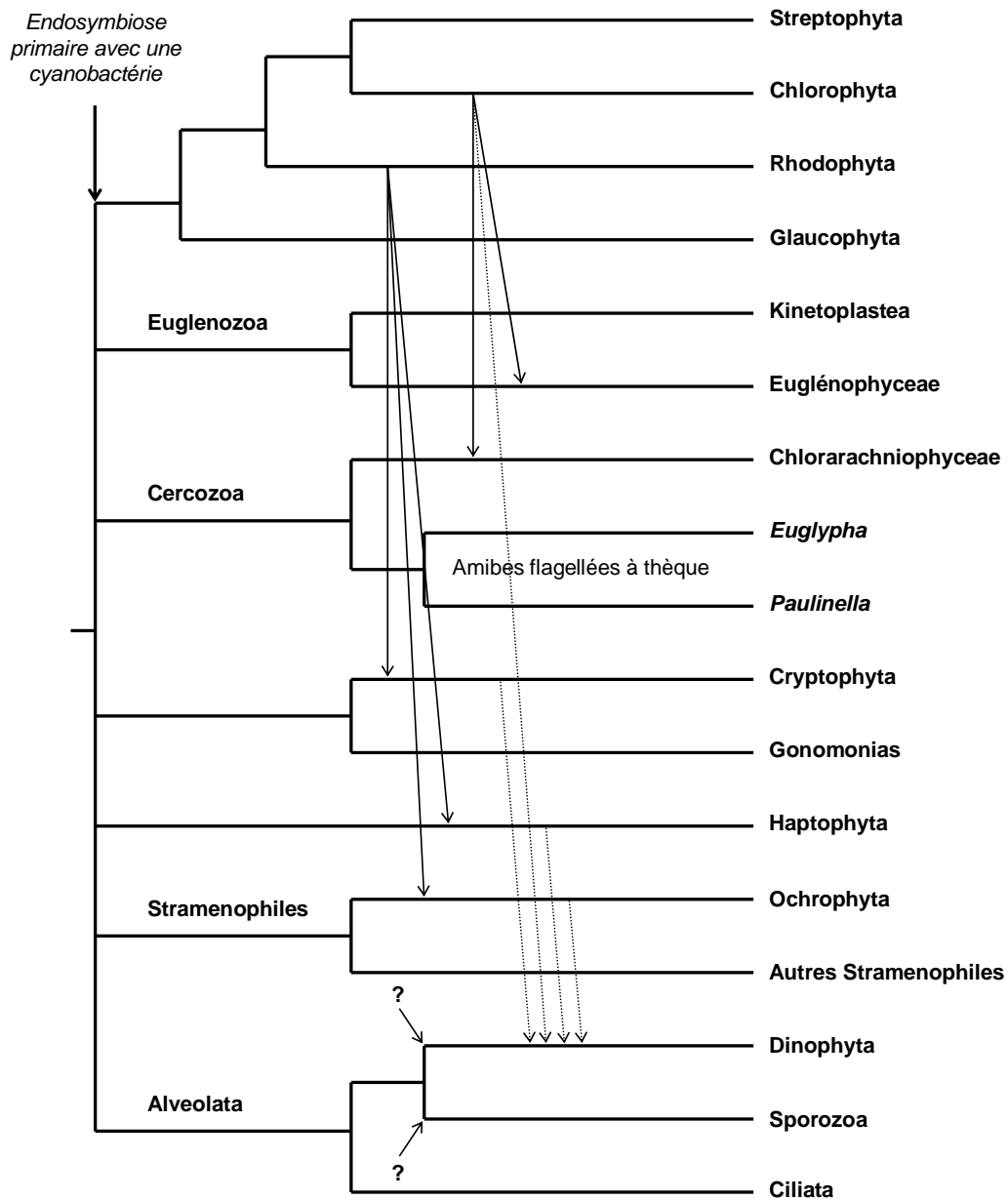


Figure 46 : Diagramme synthétique résumant l'origine des différents embranchements d'algues (de Reviere, tome 1).

2.1.3 Critères de classification des algues

De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires, le mode de nutrition, l'habitat, la nature et la localisation des pigments et des glucanes de réserve. Malgré une extrême diversité, les algues peuvent être classées en une dizaine d'embranchements selon des critères basés sur leurs compositions pigmentaires, leurs polysaccharides de réserve et des caractéristiques structurales, comme le nombre de membranes plastidiales, la disposition des thylacoïdes, la forme des crêtes mitochondriales et la nature de l'appareil flagellaire (de Reviere, tome 1).

2.1.3.1 Description des différentes classes d'algues

Selon les différents critères de classification, il existe onze groupes d'algues, un de nature procaryotique (les cyanobactéries) et dix de nature eucaryotique. Le tableau 4 décrit la composition pigmentaire, la composition des glucanes de réserve, le nombre de membranes plastidiales, ainsi que le nombre et la disposition des thylacoïdes selon les différents embranchements d'algues (de Reviere, tome 1).

Tableau 4: Caractéristiques principales des différentes classes d'algues. Avec α 1-4: amidons ; β 1-3 : laminarane , PE : Phycoérythrine, PC : Phycocyanine, APC : Allophycocyanine, Chl. : Chlorophylle (de Reviere, tome 1).

Embranchement	Pigments	Glucanes de réserve	Nombre de membranes. plastidiales	Thylacoïdes
Cyanophyta sauf « Prochlorophytes »	PE, PC, APC, Chl. <i>a</i>	α 1-4 Cytoplasmique	Sans objet	Non regroupés, épars, Phycobilisomes
« Prochlorophytes »	Chl. <i>a + b</i>	α 1-4 Cytoplasmique	Sans objet	Par 2 ou plus
Glaucophyta	PC, APC, Chl. <i>a</i>	α 1-4 Cytoplasmique	2+ peptidoglycane	Non regroupés, concentriques, Phycobilisomes
Rhodophyta	PE, PC, APC, Chl. <i>a</i> (Chl. <i>d</i>)	α 1-4 Cytoplasmique	2	Non regroupés, Phycobilisomes
Chlorophyta	Chl. <i>a + b</i>	α 1-4 Intraplasmidiale	2	Par 2 à 6
Streptophyta « Streptophycophytes »	Chl. <i>a + b</i>	α 1-4 Intraplasmidiale	2	Par 2 à 6
Streptophyta « Embryophyta »	Chl. <i>a + b</i>	α 1-4 Intraplasmidiale	2	Empilés
Chryptophyta	PE Chl. <i>a + c</i>	α 1-4 Dans le compartiment périplasmidial	4	Par 2, Phycobiline dans la lumière des thylacoïdes
Euglénophyta	Chl. <i>a + b</i>	β 1-3 Cytoplasmique	3	Par 3
Haptophyta (Prymnesiophyceae)	Chl. <i>a + c</i>	β 1-3 Cytoplasmique	4	Par 3, sans lamelle périphérique
Haptophyta (Pavlovophyceae)	Chl. <i>a + c</i>	β 1-3 Vacuolaire	4	Par 3, sans lamelle périphérique
Ochrophyta (Heterokontophyta)	Chl. <i>a + c</i>	β 1-3 vacuolaire	4	Par 3, avec lamelle périphérique
Dinophyta	Chl. <i>a + c</i>	α 1-4 Cytoplasmique	3	Par 3, espacés, sans lamelle périphérique

2.1.3.2 Procaryotes photosynthétiques

Embranchement des Cyanophyta (lignée bleue)

Les algues procaryotes appartiennent au groupe des eubactéries photosynthétiques (cyanobactéries et prochlorophytes). Elles sont essentiellement représentées par les cyanobactéries (règne des eubactéries). Plusieurs structures communes sont retrouvées au niveau de la cellule, notamment la présence d'une capsule mucilagineuse. Du point de vue de la structure et de la composition, leur paroi est proche de celle des bactéries à Gram négatif. La cellule est dépourvue d'organite. Les thylacoïdes sont diffus dans le cytoplasme (Ozenda, 2000). Les cyanobactéries possèdent de la chlorophylle *a* et les photosystèmes I et II. Elles possèdent des phycobilisomes composés de PE, PC et APC (de Reviers, tome 2).

2.1.3.3 Eucaryotes photosynthétiques

Embranchement des Glaucophyta

Cet embranchement comprend trois genres et quatorze espèces. Les glaucophytes forment un petit groupe d'algues unicellulaires, autotrophes, libres, parfois coloniales. Elles appartiennent à la même lignée que les algues rouges et vertes. Les thylacoïdes sont pourvus de phycobilisomes constitués de PC et APC. La chlorophylle *a* est également retrouvée (de Reviers, tome 2).

Embranchement des Rhodophyta (lignée rouge)

Cet embranchement comprend 70 genres et plus de 4 000 espèces décrites. Les algues rouges forment un groupe homogène bien défini. Elles sont rarement unicellulaires. Les algues rouges possèdent de la chlorophylle *a*, et des pigments surnuméraires : PE, PC et APC, disposés dans le phycobilisome. Le β,ϵ -carotène et le β,β -carotène sont présents. Les principaux xanthophylles sont la lutéine et la zéaxanthine. La paroi cellulaire est constituée de cellulose ou de xylanes pour la partie fibrillaire et de galactanes sulfatés ou mannanes pour la partie mucilagineuse (de Reviers, tome 2).

Sous-règne de Chlorobionta (lignée verte)

Les algues vertes constituent un groupe comprenant entre 550 et 570 genres et de 16 000 à 17 000 espèces. Le chloroplaste contient de la chlorophylle *a* et *b*. En majorité, les algues vertes sont microscopiques et dulçaquicoles, elles sont cependant rencontrées dans tous les types de milieu. Leur chloroplaste contient de la chlorophylle *a* et *b* (de Reviers, tome 2). Les Chlorobionta sont constituées de deux infra-règnes les Chlorophyta et les Streptophyta.

Classe des Euglénophyceae (lignée verte)

Dans la classe des Euglénophyceae, de 40 à 50 genres et 650 à 1 050 espèces sont dénombrés. Ces algues sont unicellulaires, flagellées, rarement coloniales. Un grand nombre d'euglénophycées sont incolores, certaines ont perdu leurs chloroplastes au cours de l'évolution. Lorsqu'ils sont présents, les chloroplastes des euglènes contiennent les chlorophylles *a* et *b* comme celui des algues vertes dont ils dérivent. Les euglènes contiennent du β,β -carotène et divers caroténoïdes dont les plus importants sont la néoxanthine et la diadinoxanthine (de Reviers, tome 2).

Classes des Chlorarachniophyceae (lignée verte)

Les algues de la classe de Chlorarachniophyceae sont des organismes unicellulaires, coccoïdes, amiboïdes à pseudopodes filamenteux ou monaoïdes¹. Cette classe compte cinq genres et six espèces. Les chloroplastes des chlorarachniophycées contiennent de la chlorophylle *a* et *b* (de Reviers, tome 2).

Embranchement des Cryptophyta (lignée brune)

Chez les Cryptophyta le nombre d'espèces décrites est de l'ordre de 100 à 200. Les cryptophytes sont des organismes unicellulaires flagellés. Ils contiennent les chlorophylles *a* et *c*. Les algues appartenant à cet embranchement possèdent également de la PE ou de la PC (de Reviers, tome 2).

¹ monade : organisme unicellulaire nageant à l'aide d'un ou plusieurs flagelles eucaryotiques.

Embranchement des Haptophyta (lignée brune)

Ce sont des algues à chloroplastes colorés en brun-doré par des caroténoïdes. Elles forment une lignée propre caractérisée par un organe particulier : l'haptophème. L'embranchement compte environ 80 genres et 300 espèces. Les haptophytes sont des organismes unicellulaires monadoïdes. Ce sont essentiellement des organismes planctoniques et marins. Les pigments retrouvés sont la chlorophylle *a et c* (de Reviere, tome 2).

Embranchement des Dinophyta (lignée brune)

Cet embranchement compte environ 4 000 espèces réparties dans 550 genres. Ces algues n'ont aucune parenté directe avec les autres algues mais sont affiliées aux Sporozoa et aux ciliés. Les dinophytes sont majoritairement unicellulaires. Il existe quelques rares formes filamenteuses. Elles sont caractérisées par une mitose particulière avec un fuseau externe. Un dynocaron est présent chez la majorité de ces organismes. Chez les espèces photosynthétiques, il existe plusieurs types de chloroplastes. Les dinophytes peuvent contenir divers eucaryotes endosymbiotiques. Les chloroplastes contiennent de la chlorophylle *a et c*, comme les haptophytes, les ochrophytes et les cryptophytes. Le chloroplaste typique à péridinine contient de la chlorophylle *a, c₂* comme chez les cryptophytes, les pigments surnuméraires sont principalement le β, β -carotène et la péridinine (de Reviere, tome 2).

Embranchement des Ochrophyta (lignée brune)

Les ochrophytes appartiennent au sous-règne des Hétérokonta. Ce vaste ensemble regroupe des organismes dont la caractéristique commune est soit d'être des monades pourvues d'un appareil flagellaire dit « Hétéroconté », soit d'avoir des cellules flagellées (spores ou gamètes) avec ce même type d'appareil locomoteur. L'appareil flagellaire a donné son nom à l'ensemble « Hétérokonta ». Les ochrophytes sont placés dans un vaste ensemble contenant également une dizaine de lignées d'algues microscopiques, comme les diatomées, les chrysophycées et les xanthophycées. Le chloroplaste contient de la chlorophylle *a et c*. La nature des pigments surnuméraires varie selon les différentes classes d'algues (de Reviere, tome 1 et 2).

2.1.3.4 Fonctions et particularités des pigments d'algues marines

Les pigments ont dès le début du XIX^{ème} siècle constitués un critère important dans la classification des algues. Le rôle physiologique de ces molécules est de capter l'énergie lumineuse. Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle *a*, les chloroplastes sont verts (chlorobiontes), ou bruns (Ochrophyta), ou bleus (Cyanophyta) ou rouges (Rhodophyta) (Ruiz, 2005).

Principe général de la photosynthèse

La photosynthèse est effectuée dans les chloroplastes dont la structure schématique est présentée sur la figure 47.

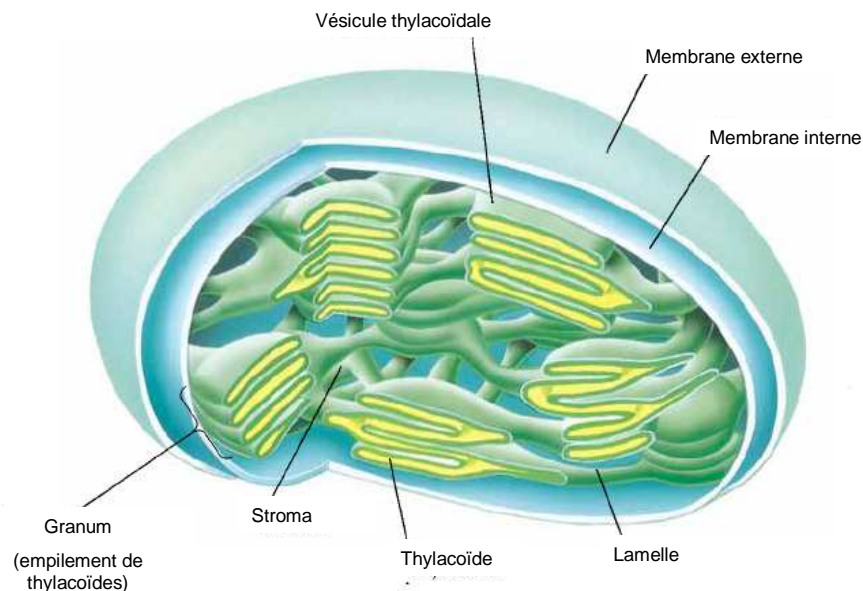


Figure 47 : Représentation schématique d'un chloroplaste (Garett & Grisham, 1999)

Le principe général de la photosynthèse est de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique (ATP) et en pouvoir réducteur (NADPH), lors des réactions dépendantes de la lumière. Cet ATP et ce pouvoir réducteur seront ensuite utilisés lors des réactions du cycle de Calvin pour synthétiser des glucides (Figure 48) (de Reviere, tome 1; Guignard, 2000).

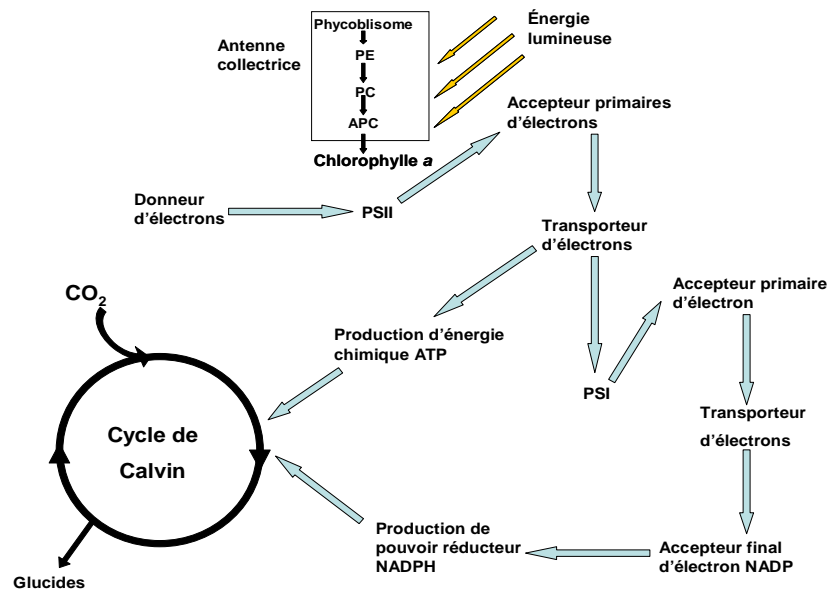


Figure 48 : Principe général de la photosynthèse chez les rhodophytes (de Reviers, tome 1)

Chez les organismes photosynthétiques oxygéniques, les deux complexes membranaires photosynthétiques sont les photosystèmes (PS). Chaque photosystème est en général constitué de deux parties (Garczarek, 2000) :

- les complexes de l'antenne périphérique qui capturent la lumière,
- les composants du centre qui comprennent le centre réactionnel et une antenne interne permettant le transfert de l'énergie d'excitation de l'antenne externe au CR.

Ces complexes sont associés à des molécules de chlorophylles et de caroténoïdes qui permettent l'absorption et le transfert de l'énergie lumineuse.

L'énergie lumineuse est captée par les pigments situés au niveau de l'antenne associée au PSII, puis est transférée au CR du PSII en passant par les molécules de chlorophylle *a* associées aux antennes mineures de ce photosystème (Garczarek, 2000)..

Le premier donneur d'électrons de PS II est le P680 qui est constitué d'un dimère de chlorophylle *a* absorbant à 680 nm. Il reçoit des électrons d'un complexe de dégagement d'oxygène qui permet l'oxydation des molécules d'eau par la lumière. Les électrons issus de l'oxydation de l'eau permettent la réduction de la plastoquinone (PQ) *via* la phéophytine puis passent par une chaîne de transfert d'électrons comprenant le complexe cytochrome *b₆/f* et le PSI. Le PSI est le réducteur final de la chaîne de transfert d'électrons et fonctionne comme une oxydoréductase à plastocyanine (PC-ferrédoxine). La chlorophylle *a*, la phylloquinone et un groupement Fer-Soufre en sont des cofacteurs (Garczarek, 2000).

Le premier donneur d'électrons de PS I, le P700 est un dimère de chlorophylle *a* absorbant à 700 nm.

Ce transfert d'électrons génère le transport de proton du stroma vers la lumière du thylacoïde. Le gradient électrochimique créé est ensuite utilisé pour permettre la synthèse d'ATP (Garczarek, 2000). La chaîne de transport des électrons lors de la photosynthèse est présentée sur la figure 49.

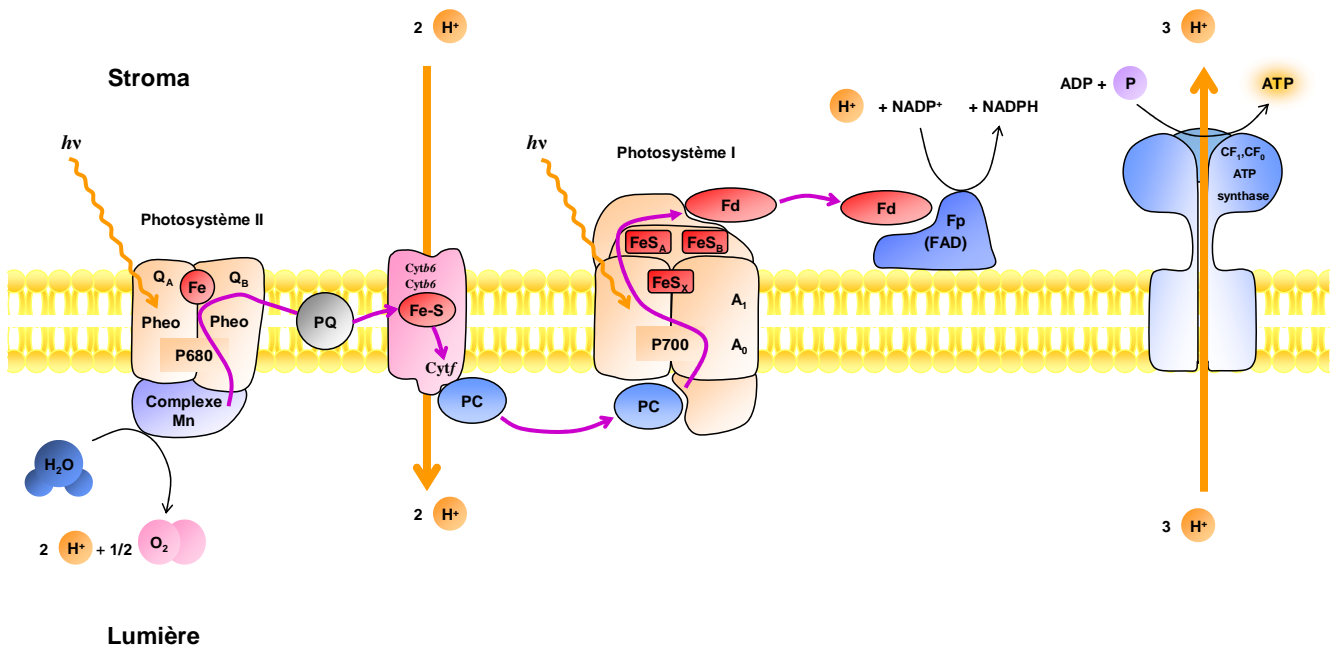


Figure 49 : Chaîne de transport d'électrons dans les membranes thylacoïdales eucaryotes (Garett & Grisham, 1999)

Les différentes classes de pigments

Chlorophylles

Les chlorophylles sont des molécules solubles dans les solvants organiques et conférant la couleur verte aux chloroplastes. Ce sont des macrocycles tétrapyrroliques métallés par du magnésium et substitués par une chaîne phytyle (Figure 50). Ces molécules impliquées dans les processus d'oxydoréduction photochimique des milieux biologiques assurent d'une part la collecte énergétique des photons, et d'autre part le transfert d'énergie permettant ainsi la transformation du dioxyde de carbone et de l'eau en molécules organiques (de Reviere, tome 1; Ruiz, 2005).

A l'origine de la photosynthèse, toutes les algues possèdent de la chlorophylle *a* (Guignard, 2000). Malgré cette caractéristique commune, certains phylums se distinguent par la présence de chlorophylles *b* ou *d*. Les algues vertes renferment, comme les plantes supérieures et contrairement aux autres algues, de la chlorophylle *b* tandis que les algues rouges possèdent en faible quantité de la chlorophylle *d* (de Reviere, 2002; Ruiz, 2005).

Dans le cas de la chlorophylle *c*, il y a absence de la chaîne phytyle. L'absence de cette chaîne lipophile ne lui permet pas de se fixer dans la membrane du thylacoïde, comme les chlorophylles *a*, *b*, *d*. La fixation se fait donc par l'intermédiaire de protéines membranaires (de Reviere, tome 1; Ruiz, 2005).

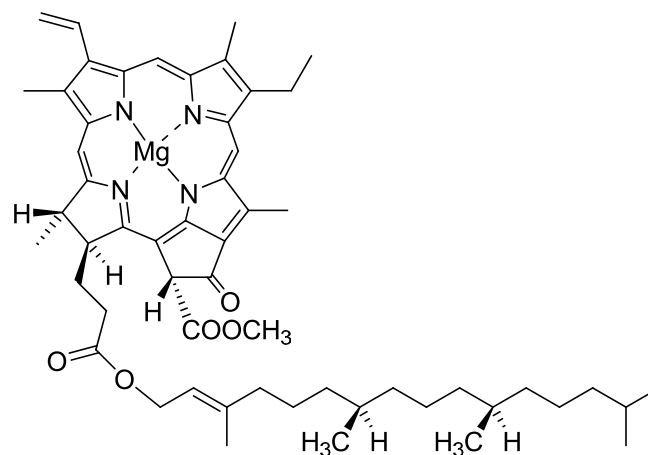


Figure 50 : Structure de la chlorophylle *a*

Les phéopigments

Les phéopigments sont issus de la dégradation des chlorophylles. Dans de nombreux produits de dégradation de la chlorophylle, le cycle tétrapyrrolique reste intact. Les enzymes impliquées dans ce processus de dégradation sont responsables de phéophytination, de déphytylation, de décarboxyméthylation et d'allomérisation des chlorophylles (Jeffrey *et al.*, 1997).

Les phéophytines, analogues des chlorophylles mais sans atome de magnésium, ainsi que les phéophorbides correspondant à de la chlorophylle mais sans atome de magnésium et sans chaîne phytyle, sont classés parmi les phéopigments. La figure 51 représente la structure chimique du phéophorbide *a*.

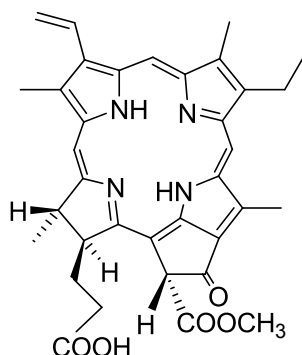


Figure 51 : Structure chimique du phéophorbide *a*

Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont constitués de deux classes de composés : les carotènes et les xanthophylles. Les premiers sont des molécules terpéniques pouvant être assimilées à la condensation de chaînes de 20 carbones. Les seconds découlent de l'oxydation progressive des carotènes (Cf. figure 52) (de Reviens, tome 1; Ruiz, 2005; Jeffrey *et al.*, 1997).

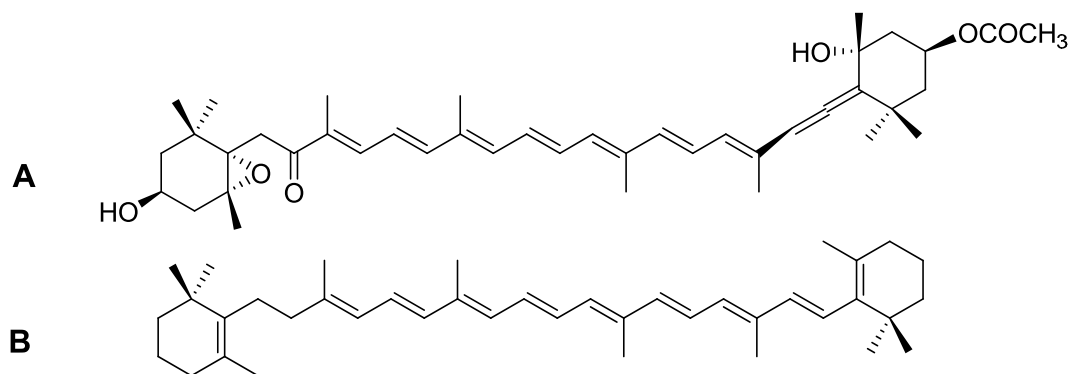


Figure 52 : Structure chimique de caroténoïdes : fucoxanthine (A), β,β-carotène (B)

Le rôle des caroténoïdes consiste en la protection de l'appareil photosynthétique contre la photo-oxydation (Cf. figure 53). Chez les Chlorophyceae, lors de fortes intensités lumineuses, la violaxanthine est réduite (déépoxydée) en zéaxanthine. L'excès d'énergie non utilisée par l'antenne collectrice est alors éliminé évitant, par la suite, la production d'oxygène singulet nuisible à la cellule. Sous une intensité lumineuse réduite, la zéaxanthine est de nouveau oxydée en violaxanthine (de Reviere, tome 1; Ruiz, 2005).

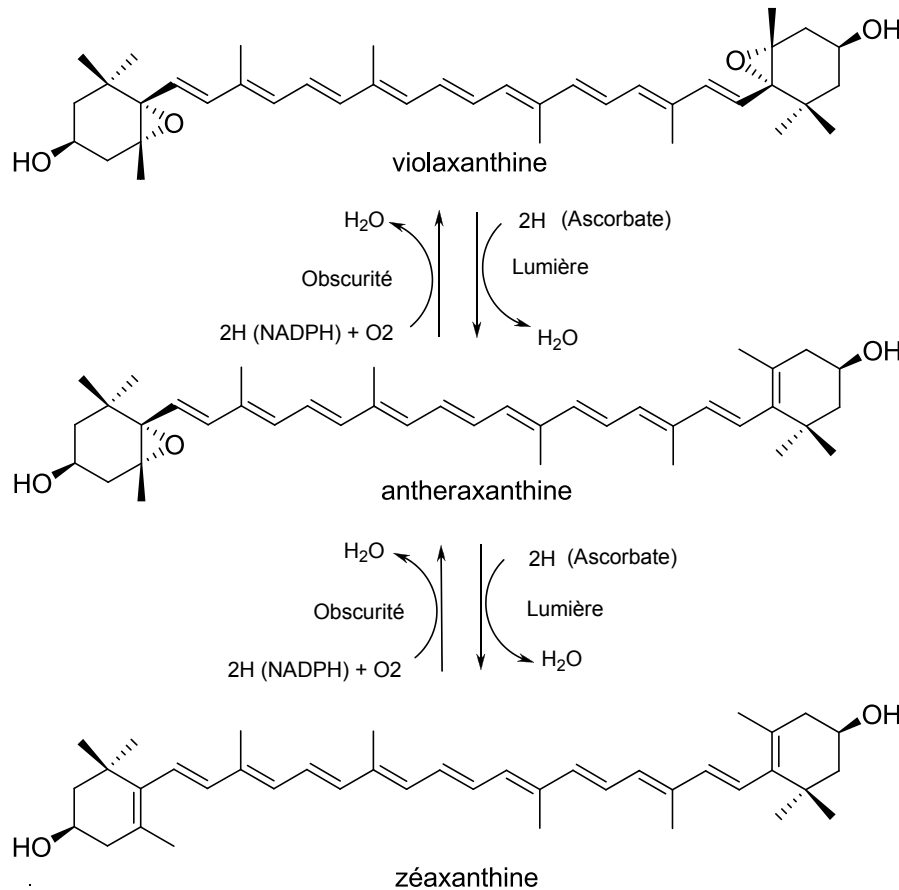


Figure 53 : Cycle des xanthophylles chez les Chlorobiontes (Jeffrey *et al.*, 1997)

Chez certains ochrophytes, le cycle des xanthophylles est effectué par la diatoxanthine et la diadinoxanthine. Lors de fortes intensités lumineuses, la diadinoxanthine est réduite (déépoxydée) en diatoxanthine. Sous une intensité lumineuse réduite, la diatoxanthine est de nouveau oxydée en diadinoxanthine (Cf. figure 54) (Jeffrey *et al.*, 1997).

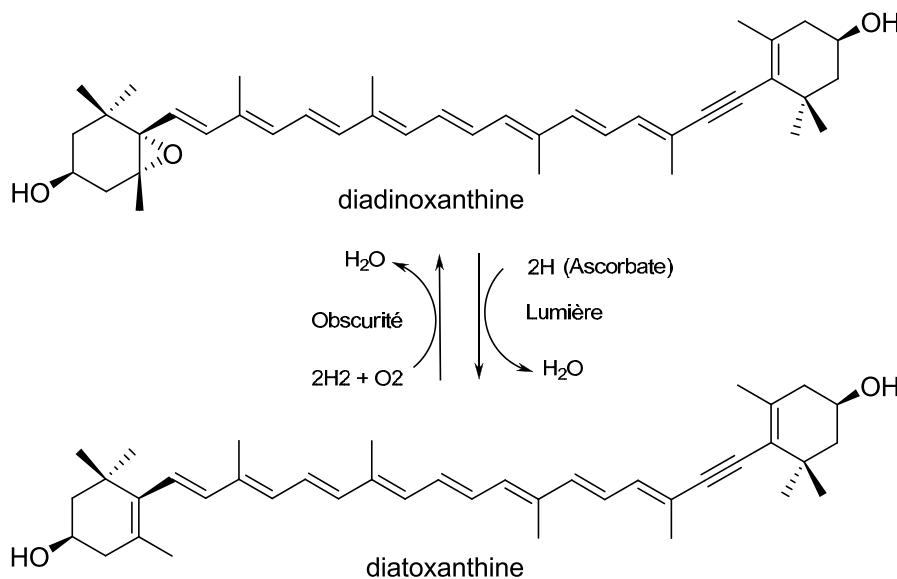


Figure 54 : Cycle des xanthophylles chez les ochrophytes (Jeffrey *et al.*, 1997)

Phycobiliprotéines

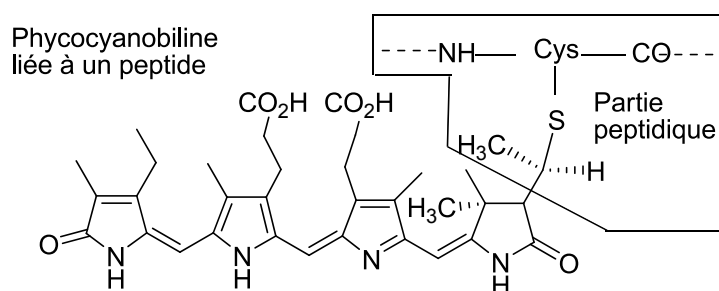


Figure 55 : Structure de la phycocyanobiline (de Reviere, tome 1)

Les phycobiliprotéines, contrairement aux chlorophylles, sont solubles dans l'eau. Elles comportent une partie protéique et des chromophores (ou bilines) liés de façon covalente à la protéine. Les chromophores sont responsables de la capture de l'énergie lumineuse et de la couleur du pigment. Ce sont des groupes tétrapyrroliques, mais au contraire des chlorophylles, ils ne sont pas cyclisés.

Les phycobiliprotéines sont subdivisées en trois groupes principaux : phycoerythrine (rouge), phycocyanine (bleue), et allophycocyanine (bleu turquoise). Les chromophores sont les phycocyanobilines, les phycoérythrobilines et les phycourobilines (Cf. figure 55).

Les biliprotéines diffèrent par le nombre et la nature des chromophores disposés sur les sous-unités protéiques. Chez les algues bleues et rouges, ces pigments sont localisés dans des structures situées à la surface des thylacoïdes : les phycobilisomes (Cf. figure 7). Le rôle physiologique des phycobiliprotéines est de capter des photons de longueurs d'onde différentes de ceux captés par les chlorophylles et de transmettre cette énergie lumineuse au centre réactionnel. (Cf. figure 56) (de Reviere, tome 1; Grossman *et al.*, 1993).

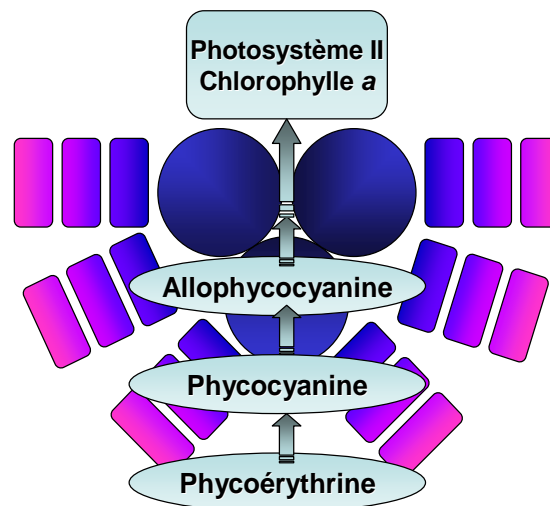


Figure 56 : Disposition des phycobilines dans un phycobilisome (de Reviere, tome 1)

2.2 DONNEES CONCERNANT LES MOLECULES NATURELLES ANTIPROLIFERATIVES ISSUES DES ALGUES

2.2.1 Etudes menées sur les macroalgues

Chimiquement, les métabolites bioactifs retrouvés chez les algues incluent les phénols, les molécules hétérocycliques, les stérols, les terpènes, les polysaccharides, les peptides et les protéines (Bhakuni & Rawat, 2005). Pour illustrer l'importance des recherches entreprises chez les macroalgues, le paragraphe suivant relate quelques études consacrées à la recherche de molécules anticancéreuses issues de ces organismes.

De nombreux travaux sont consacrés à l'évaluation de l'activité d'extrait de macroalgues. Notamment, un extrait de l'algue brune *Bifurcaria bifurcata* induit de manière irréversible l'arrêt de la prolifération cellulaire sur la lignée NSCLC-6 de cancer du poumon (Moreau *et al.*, 2006a). De même, un extrait éthanolique issu de l'algue *Corallina piulifera* induit l'apoptose sur les cellules HeLa (adénocarcinome cervical humain) (Kwon *et al.*, 2007). Des extraits de *Bifurcaria bifurcata*, de *Cystoseira tamaricifolia*, de *Demarestia ligulata* et de *Dictyota dichotoma* présentent des activités cytotoxiques sur trois lignées cellulaires cancéreuses (Daudi : lymphôme, Jurkat : leucémie et K562 : leucémie) (Zubia *et al.*, 2009). Des extraits des algues *Palmaria palmata*, *Laminaria setchellii*, *Macrocystis integrifolia* et *Nereocystis leutkeana* montrent des activités antiprolifératives sur la lignée d'adénocarcinome cervical humaine HeLa (Yuan & Walsh, 2006). Un extrait de *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* montre des effets antiprolifératifs et apoptotiques sur les lignées de neuroblastome SHSY5Y et Kelly (Cavas *et al.*, 2006).

D'autres études ont été consacrées aux hydrolysats de macroalgues obtenus enzymatiquement. Par exemple, un hydrolysat obtenu enzymatiquement de l'algue brune *Ecklonia cava* montre une activité antiproliférative sur des lignées murines de cancer du colon CT-26, sur la lignée de leucémie humaine THP-1 et U937 et les cellules de mélanome de souris B-16 (Athukorala *et al.*, 2006). De même, les transglucanes produits par action enzymatique sur les laminaranes ont des propriétés antitumorales (Smit, 2004; Kaeffer *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1992).

Le chondriamide A (Cf. figure 57) isolée de l'algue rouge *Chondria atropurpurea* montre un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses du colon (Palermo *et al.*, 1992; Smit, 2004).

Blunt *et al* ont référencé les molécules isolées d'algues verte, brune et rouge en 2006. L'algue rouge *Laurencia obtusa* est la source du perforenol B (Cf. figure 57) qui montre une forte activité antiprolifératives sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (Kladi *et al.*, 2006; Blunt *et al.*, 2008).

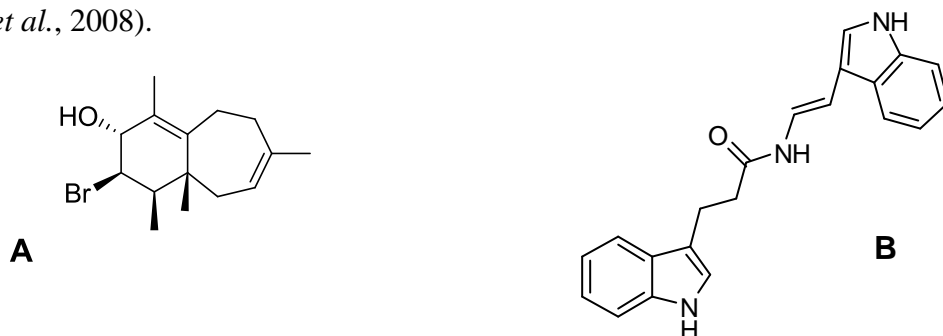


Figure 57 : Structure chimique du perforenol B (A) et de la chondriamide A (B)

Chez les Chlorophyta, l'exemple le plus connu de molécules antitumorales, est le kahalalide F. Cette molécule a été isolée dans un premier temps du mollusque *Elysia rufescens*. Mais la source originelle de cette molécule est l'algue *Bryopsis spp*, qui fait partie du régime alimentaire de *E. rufescens* (Hamann *et al.*, 1996; Hamann & Scheuer, 1993; Smit, 2004).

Des polysaccharides sulfatés présentent également des activités cytotoxiques. Les fucoïdanes sont connus pour avoir des propriétés anticancéreuses, antimétastastiques chez la souris (Smit, 2004).

Le Sarg A, un polysaccharide extrait de l'algue brune *Sargassum strenophyllum* a une action antiangiogénique sur la membrane chorioallantoïque des œufs de poules (Dias *et al.*, 2008). Les injections de ce polysaccharide à des souris *swiss*, auxquelles il a été inoculé une tumeur cancéreuse B16F10 de mélanome montrent une diminution de la croissance tumorale avec un effet dose-dépendant (Dias *et al.*, 2008). De même, un polysaccharide issu de l'algue *Capsosiphon fulvescens* induit l'apoptose sur les cellules AGS de cancer gastrique (Kwon & Nam, 2007).

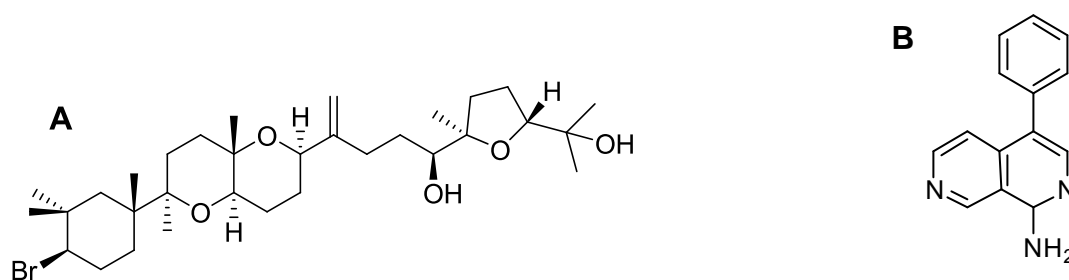


Figure 58 : Structure chimique du dehydrothysiferol (A) et de la lophocladine B (B).

Le triterpène squalénoïde marin dehydrothysiferol (Cf. figure 58) isolé de l'algue rouge *Laurencia viridis* montre des activités cytotoxiques sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (P-388, A549, MEL28 et HT29). Il induit également l'apoptose sur les lignées T47D, ZR-75-I, HS578 et MDA-MA-231 du cancer du sein (Pec *et al.*, 2003). La lophocladine B (alcaloïde) (Cf. figure 58) a été isolée à partir des algues *Lophocladia sp.* Cette molécule est cytotoxique pour les lignées cellulaires cancéreuses du sein (MDA-MB-435) et du poumon (NCI-H460) (Gross *et al.*, 2006).

Les travaux présentés ici ne constituent pas une liste exhaustive. La revue de Folmer *et al* (2010) intitulée « Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds » consacre trois paragraphes aux composés anticancéreux isolés à partir de Chlorophyceae, Rhodophyta et de Phaeophyta. Elle permet d'évaluer l'importance des macroalgues en tant que source de molécules anticancéreuses (Folmer *et al.*, 2010).

2.2.2 Potentiel des microalgues marines

2.2.2.1 Biodiversité des microalgues marines

Il existe quatre lignées de microalgues, chacune possédant de 1 à 7 embranchements pouvant chacun compter jusqu'à 10 000 espèces. La classification des microalgues selon la composition pigmentaire ainsi que leur biodiversité est présentée dans le tableau 5, (Jeffrey *et al.*, 1997).

Tableau 5 : Diversité des microalgues marines et dulçaquicoles (Jeffrey *et al.*, 1997)

Embranchement / Classe	Nom usuel	Genre	Nombre approximatif d'espèces
<u>Lignée brune : chlorophylles a et c</u>			
Dinophyta	dinoflagellés	550	4000
Ochrophyta	algues dorées		
Bacillariophyceae	diatomées	210	5500 à 10000
Chrysophyceae	Chrysophyte, silicoflagellés	120	1000
Eustigmatophyceae		6	12
Raphidophyceae	raphidophytes	4	9
Xanthophyceae		90	600
Haptophyta	algues dorées		
Prymnesiophyceae	coccolithophorides	50	500
Cryptophyta	cryptonomades	8	> 50
<u>Lignée verte : chlorophylles a et b</u>			
Chlorophyta			
Chlorophyceae	algues vertes	350	2500
Prasinophyceae	flagellés verts	13	120
Euglenophyta	euglénoïdes	43	650 à 800
<u>Lignée rouge : chlorophylle a et biliprotéines</u>			
Rhodophyta	algues rouges	3	10
<u>Cyanobactéries: chlorophylle a et biliprotéines</u>			
Cyanophyta	cyanobactéries		> 10000
Prochlorophyta	prochlorophytes	3	3

2.2.3 Etudes menées sur les microalgues marines

Les invertébrés marins comme les éponges, les cnidaires, les tuniciers et les bryozoaires sont une source de molécules à activité biologique. La plupart de ces organismes ont une flore commensale incluant des bactéries, des microalgues (dont les cyanobactéries) et des moisissures. De nombreux métabolites secondaires retrouvés chez les invertébrés proviennent de cette flore (Dunlap *et al.*, 2007).

L'exemple le plus connu est la mise en évidence des dolastatines, agents déstabilisants des microtubules. Les dolastatines ont été isolées initialement du mollusque *Dolabella auricularia*. En réalité, elles proviennent des cyanobactéries du genre *Symploca* (Bai *et al.*, 1993; Mitra & Sept, 2004; Pettit *et al.*, 1981; Simmons *et al.*, 2005).

Plus de 120 alcaloïdes issus de cyanobactéries ont été décrits entre 2001 et 2006, et ils présentent une large diversité de structures chimiques avec une grande variété d'activités biologiques (Tan, 2007). Par exemple, le jamaïcamide A (Cf. figure 59), neurotoxine, issue de *L. majuscula* présente des activités cytotoxiques sur la lignée de cancer du poumon H460 (Edwards *et al.*, 2004). La wewakpeptine A (Cf. figure 59), issue de *L. semiplena* est cytotoxique contre la lignée de cancer du poumon H 460 (Han *et al.*, 2005; Tan, 2007; Edwards *et al.*, 2004).

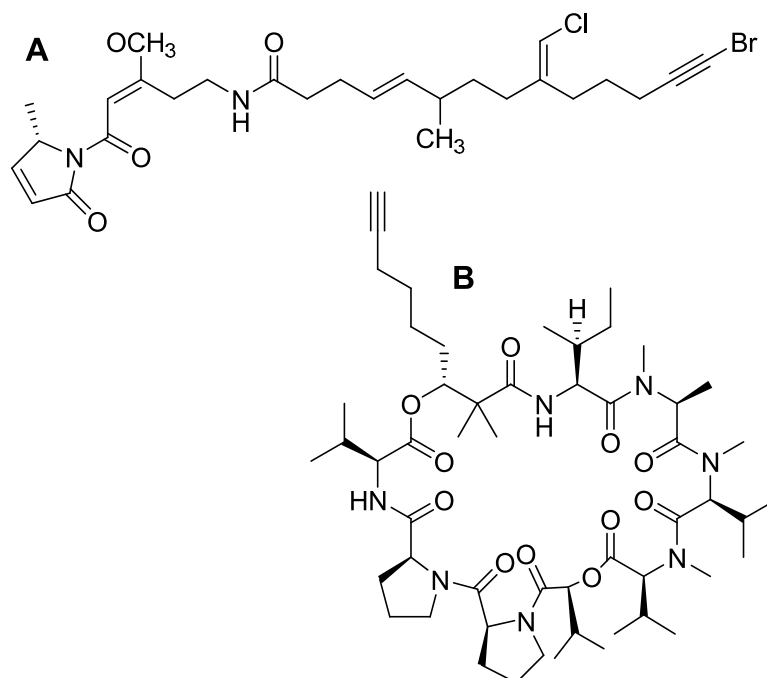


Figure 59 : Structure chimique du jamaïcamide A (A) et de la wewakpeptine A (B)

Arthrospira platensis ou « Spiruline » montre des activités antioxydantes. Certains de ses extraits enrichis en sélénium ont montré une activité antiproliférative et apoptotique sur des lignées de cancers du sein (Chen *et al.*, 2009).

Les espèces du groupe des dinoflagellés sont les plus intéressantes. En effet, elles partagent de nombreux métabolites uniques avec les cyanobactéries (Shimizu, 2003). Ces microalgues sont également connues pour former des « bloom » toxiques, et produisent de nombreux métabolites secondaires, comme des composés hétérocycliques, des éthers polycycliques, des polyketides et des macrolides (Shimizu, 2003).

Les amphidinolides, macrolides produits par les dinoflagellés du genre *Amphidinium* ont des propriétés antitumorales. Ils sont cytotoxiques sur les cellules de lymphome murin L210, et les cellules cancéreuses de l'épiderme KB (Tsuda *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1994; Kobayashi & Ishibashi, 1997). Un composé dérivé, le caribenolide I, montre une forte cytotoxicité contre la lignée de cancer du colon HCT 116. (Camacho *et al.*, 2007; Daranas *et al.*, 2001; Kobayashi & Ishibashi, 1997). La structure chimique de l'amphidinolide A et du caribenolide I sont présentés sur la figure 60.

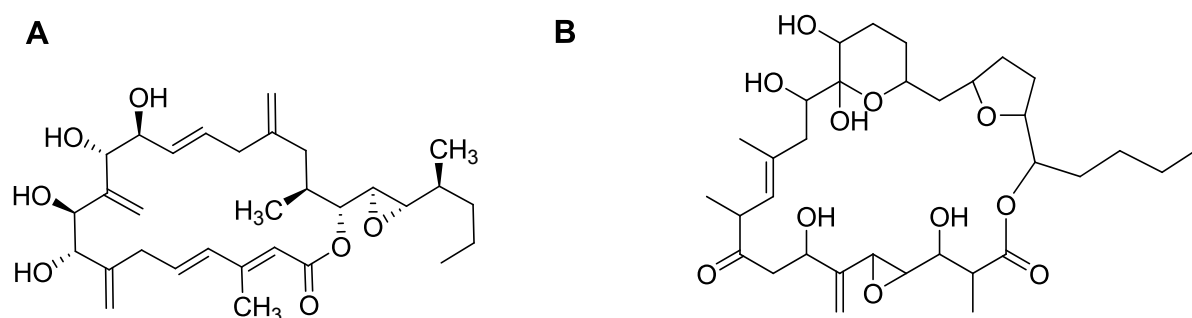


Figure 60 : Structure chimique de l'amphidinolide A (A), du caribenolide I (B).

Outre les dinoflagellées, des activités anticancéreuses ont également été identifiées chez des microalgues marines non toxiques. Par exemple les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* produisent de l'acide domoïque (Cf. figure 61), molécule neurotoxique (Dunlap *et al.*, 2007).

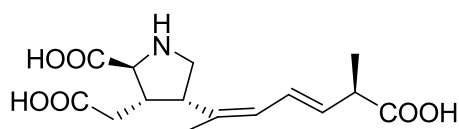


Figure 61 : Structure chimique de l'acide domoïque

Par ailleurs, de nombreuses études sont consacrées à l'évaluation d'extrait de microalgues marines. Par exemple, il a été montré que les extraits de *Synechococcus sp*, *Chlamydomonas nivalis* et *Rostoc ellipsoforum* présentaient des capacités antioxydantes (Li *et al.*, 2007). Moreau *et al.*, en 2006, ont montré que la fucoxanthine extraite d'*Odontella aurita* présentait un potentiel antiprolifératif et apoptotique sur des lignées de cancer du poumon. L'activité de la fucoxanthine a ensuite été vérifiée sur de nombreuses autres lignées cancéreuses. Deux monoacylgalactosyl diacylglycérols isolés de la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* sont capables d'induire l'apoptose sur des cellules épithéliales de souris (W2) (Andrianasolo *et al.*, 2008). Enfin des extraits d'espèces du genre *Chlorella* ont montré des activités antiprolifératives sur les lignées H1299, A549, et H1437 de cancer du poumon (Wang *et al.*, 2010) et une activité antiproliférative et apoptotique sur la lignée de cancer du colon HCT116 (Cha *et al.*, 2008).

La revue de Folmer *et al.* (2010) permet d'évaluer l'importance des microalgues en tant que source de molécules. Une partie de cet article est consacrée aux composés anticancéreux isolés de diatomée, de dinoflagellés et de cyanobactéries (Folmer *et al.*, 2010).

2.2.4 Apport des biotechnologies

Comme les autres microorganismes, les microalgues présentent l'avantage d'être cultivables en bioréacteurs (Olaizola, 2003). A l'heure actuelle, les microalgues marines produisant des lipides en grandes quantités font l'objet de toutes les attentions notamment pour la production de biocarburant (Mata *et al.*, 2010). Mais elles présentent également un fort potentiel pour d'autres domaines comme la recherche médicale, le secteur agro-alimentaire ou cosmétique (Milledge, 2010).

Parmi les dizaines de milliers d'espèces de microalgues marines existantes, seulement quelques milliers sont référencés et conservés. Quelques centaines ont fait l'objet d'investigation pour leur composition biochimique et seulement quelques unes sont cultivées pour des applications industrielles (Olaizola, 2003).

Par exemple, les microalgues du genre *Chlorella* sont produites par plus de 70 entreprises. Elles sont commercialisées comme nutraceutiques ou comme compléments alimentaires. Les espèces du genre *Arthrospira* (Spirulina) sont utilisées en alimentation humaine en raison de leurs hautes teneurs en vitamines, protéines et polysaccharides (Milledge, 2010).

Les microalgues sont également utilisées pour la production de caroténoïdes. Le β -carotène et l'astaxanthine sont des colorants utilisés en alimentation humaine et animale. La concentration moyenne des caroténoïdes chez les microalgues est de 0,1 à 2%. Cependant les

espèces du genre *Dunaliella* dans des conditions de fortes salinités et sous de fortes irradiations lumineuses peuvent produire jusqu'à 14% de β -carotène (Milledge, 2010; Dufossé *et al.*, 2005; Del Campo *et al.*, 2000).

L'astaxanthine est un autre caroténoïde dérivé d'algue. Sa principale utilisation est l'aquaculture, elle est également utilisée comme complément alimentaire et antioxydant. Elle est produite par les microalgues du genre *Haematococcus* (Milledge, 2010; Lorenz & Cysewski, 2000).

Les microalgues sont également utilisées pour produire des phycobiliprotéines, comme la phycocyanine et la phycoérythrine. Ces pigments sont produits par les algues du genre *Spirulina*, *Porphyridium* et *Rhodella*. Ils sont utilisés comme colorant en cosmétique, dans le secteur de l'alimentation et à des fins de recherche pour leurs propriétés fluorescentes.

Les dinophytes du genre *Cryptocodinium* sont sources d'acides gras polyinsaturés et sont utilisés comme complément alimentaire. Dans le tableau 6 sont présentés les genres microalgues utilisés à des fins industrielles, avec leur production annuelle en tonne et leurs applications (Milledge, 2010).

Tableau 6 : Genres microalgues utilisés en industrie, avec leurs applications (Milledge, 2010).

Genre Microalgues utilisés	Production annuelle en tonnes	Applications et produits
<i>Arthrospira</i>	3000	Alimentation animale et humaine, phycobiliprotéines, cosmétique
<i>Chlorella</i>	2000	Nutrition humaine, aquaculture, cosmétique
<i>Dunaliella</i>	1200	Nutrition humaine, cosmétique, β -carotène
<i>Aphaniezomenon</i>	500	Nutrition humaine
<i>Haematococcus</i>	300	Aquaculture, Astaxanthine
<i>Cryptocodinium</i>	240	Acide Docosaexanoïque
<i>Schizochytrium</i>	10	Acide Docosaexanoïque

La plupart des productions industrielles sont réalisées dans des bassins à ciel ouvert. Ces systèmes de production sont peu coûteux, mais ils présentent certains inconvénients :

- une faible diffusion de la lumière.
- La monoculture d'une espèce unique est difficile à maintenir en raison de contaminations extérieures.
- La récolte est dans certains cas compliquée.

Dans ces conditions, la production de composés pharmaceutiques et additifs alimentaires est difficile. Les photobioréacteurs sont utilisés pour palier ces difficultés. Ils permettent de réguler des paramètres comme le pH, la température, et l'irradiation lumineuse (Perez-Garcia *et al.*, 2010).

La recherche de molécules à activité biologique issues de microalgues marines peut donc bénéficier de l'ensemble du savoir développé autour de la culture des microalgues.

2.2.5 Conclusion : les microalgues marines, un vivier inexploité de molécules anticancéreuses

Parmi les quatre lignées d'algues existantes, seule la lignée verte a quitté le milieu marin. Les algues rouges et brunes n'ont aucun équivalent terrestre et leurs métabolites sont souvent originaux (Kornprobst, 2005).

Par ailleurs, les différents travaux traitant de la mise en évidence de composés bioactifs issus de microalgues montrent qu'elles sont une source de molécules à activité biologique et notamment anticancéreuses.

Les microalgues marines présentent une grande biodiversité et compte tenu de la quantité d'espèces microalgales non étudiées, du manque de données précises sur leur composition biochimique, les microalgues marines apparaissent comme un champ d'investigation majeur pour la mise en évidence et la découverte d'une molécule originale utilisable en cancérologie. Leur potentiel est d'autant plus important, que comme de nombreux microorganismes, elles sont cultivables en bioréacteur.

SECTION 4 : POSITIONNEMENT ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les thérapies ciblées sont aujourd'hui un axe de recherche majeur en oncologie. Les molécules agissant sur la régulation du cycle cellulaire ou les voies de communication font l'objet de toutes les attentions, et notamment les molécules restaurant le phénomène d'apoptose chez les cellules cancéreuses. L'approbation de nouveaux médicaments, comme le temsirolinus, est emblématique de l'évolution de la recherche de molécules anticancéreuses issues du milieu naturel.

Les éponges, les gorgones, les tuniciers et les bryozoaires constituent la principale source de molécules anticancéreuses issues du monde marin. Cependant, la plupart de ces organismes ont une flore commensale incluant des bactéries, des microalgues et des moisissures (Dunlap *et al.*, 2007) pouvant être à l'origine de la production de métabolites secondaires. Ce phénomène est illustré par les dolastatines produites par les cyanobactéries du genre *Symploca*. Cet aspect, ainsi que la possibilité de cultiver les microorganismes sont à l'origine de l'intérêt croissant de l'industrie pharmaceutique pour ces microorganismes.

Les microalgues marines constituent un groupe de microorganismes comptant plus d'une dizaine de milliers d'espèces. Ces organismes ont déjà montré leur potentiel dans le monde industriel avec la production de nutraceutiques, de pigments et d'acides gras polyinsaturés. Les lignées rouge et brune des algues n'ont pas d'équivalent dans le monde végétal terrestre (Kornprobst, 2005). Ces caractéristiques les rendent particulièrement attractives pour la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses.

Les travaux présentés dans ce mémoire sont consacrés à la mise en évidence de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. Ils s'articulent autour de deux chapitres.

Le premier chapitre expose les résultats obtenus concernant l'évaluation du potentiel antiprolifératif de plusieurs extraits de microalgues marines sur différentes lignées cellulaires cancéreuses.

A la suite de ce criblage, une démarche bioguidée sera adoptée pour isoler et identifier le ou les principes actifs présents dans les extraits d'intérêt. Les potentiels cytotoxique, cytostatique et apoptotique de la molécule identifiée seront ensuite étudiés.

Le second chapitre sera, dans un premier temps, consacré à la standardisation des méthodes d'analyse et de purification des principes actifs de microalgues marines.

Une seconde partie sera consacrée au développement des méthodes d'extraction de molécules à activité biologique par des procédés classiques (macération) ou innovants tels que l'extraction sous irradiation micro-onde.

CHAPITRE 2

**EVALUATION DU POTENTIEL ANTIPROLIFERATIF
D'EXTRAITS DE MICROALGUES MARINES.
ISOLEMENT D'UN PIGMENT ANTIPROLIFERATIF ISSU DE
*DUNALIELLA TERTIOLECTA***

1 CONTEXTE ET DEMARCHE

L'étude qui est présentée dans ce chapitre a pour but d'identifier des molécules issues de microalgues marines utilisables en chimiothérapie.

Pour ce faire, les espèces de microalgues marines *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis salina* et *Polypodochrysis teissieri* ont été sélectionnées. Des extraits dichlorométhanique, éthanolique et aqueux de ces microalgues ont été évalués pour leur potentiel antiprolifératif. L'évaluation de cette activité a été réalisée sur des cultures monocouches de lignées cellulaires cancéreuses MDA-MB-231 (cancer du sein), MCF-7 (cancer du sein), A549 (cancer du poumon non à petites cellules) et LNCap (cancer de la prostate). Les cultures monocouches ont l'avantage de fournir des résultats robustes (Bailly, 2009).

Un extrait de *Dunaliella tertiolecta*, identifié comme celui présentant l'une des activités les plus intéressantes sur la lignée de cancer du sein MCF-7, sera utilisé pour mener une démarche bioguidée afin d'isoler le ou les principes actifs.

Cette méthodologie présentera l'avantage de purifier rapidement une molécule portant l'activité recherchée. Le principe actif isolé a été caractérisé en spectrométrie de masse haute résolution.

L'activité antiproliférative de la molécule a ensuite été étudiée, en considérant :

- sa capacité à provoquer la mort des cellules ou son potentiel cytotoxique,
- sa capacité à bloquer la division cellulaire ou son potentiel cytostatique,
- son potentiel pro-apoptotique.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 SELECTION DES ESPECES DE MICROALGUES MARINES

La fucoxanthine, un xanthophylle retrouvé chez les Bacillariophyta, Chrysophyceae, Raphidophyceae et des Prymnesiophyceae (Cf tableau 7) a fait l'objet de nombreuses études. Son activité antiproliférative, apoptotique et cytostatique sur des lignées de cancer bronchique a été démontrée par Moreau *et al* en 2006. De plus, ce pigment a également montré des activités apoptotiques sur des cellules de leucémie (Hosokawa *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2010; Nakazawa *et al.*, 2009), des cellules de cancer du colon (Hosokawa *et al.*, 2004; Nakazawa *et al.*, 2009), de la prostate (Kotake-Nara *et al.*, 2005) et des cellules cancéreuses hépatiques (Das *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2005). Notre étude exclut les classes ou embranchements de microalgues possédant ce pigment, sauf pour une espèce étudiée. Le tableau 7 présente la composition pigmentaire des différents embranchements ou classes de microalgues marines. Dans le souci de ne pas être redondant avec de précédentes études, les espèces de microalgues sélectionnées ne doivent pas avoir déjà été étudiées pour leur activité antiproliférative sur des lignées cellulaires cancéreuses. Enfin, les microalgues sélectionnées doivent être cultivables en photobioréacteur.

En tenant compte de ces trois critères, quatre espèces de microalgues marines ont été sélectionnées pour cette étude :

- *Nannochloropsis salina*,
- *Nannochloropsis oculata*,
- *Dunaliella tertiolecta*,
- *Polypodochrysis teissieri*.

Tableau 7 : Principaux pigments caractéristiques des procaryotes photosynthétiques et des différentes classes ou divisions d'algues (Garczarek, 2000; Jeffrey et al., 1997)

Code : ++ : pigment majeur (>10%) ; + : pigment mineur (1-10% des chlorophylles ou des caroténoïdes totaux) ; - : pigments absents ou non détectés.

Pigments	Embranchement ou classe												
	Cyanophyta	Prochlorophyta	Rhodophyta	Cryptophyta	Chlorophyceae	Prasinophyceae	Euglénophyta	Eustigmatophyceae	Bacillariophyceae	Chrysophyceae	Raphidophyceae	Prymnesiophyceae	Dinophyta
Chlorophylles													
Chl <i>a</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Chl <i>b</i>	-	++	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
Chl <i>c</i> (<i>c</i> ¹ , <i>c</i> ² , <i>c</i> ³ , MgDVPa ₅)	-	++	-	++	-	-	-	-	++	++	++	++	++
Divinyl Chl <i>a</i>	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Divinyl Chl <i>b</i>	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carotène (α ou β)	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xanthophylles													
Alloxanthine	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lutéine	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-
Néoxanthine	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-
Prasinoxanthine	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Violaxanthine	-	-	-	-	++	++	-	++	-	-	-	-	-
Zéaxanthine	++	++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Fucoxanthine	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-
19'-HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
19'-BF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
Diadino, diatoxanthine	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++	++	++	++
Péridinine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Biliprotéines													
Allophycocyanine	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phycocyanine	++	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phycocérythrine	++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.1.1 Les espèces de microalgues étudiées

2.1.1.1 *Nannochloropsis salina* et *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis salina et *Nannochloropsis oculata* appartiennent à la classe des Eustigmatophyceae. Les espèces du genre *Nannochloropsis* sont subsphériques de 2 à 4 μm de diamètre ou cylindriques de 3 à 4 \times 1,5 μm (Antia & Cheng, 1982).

Des observations microscopiques de *N. salina* et *N. oculata* sont présentées sur la figure 62. Les Eustigmatophyceae appartiennent à la lignée brune des microalgues marines. Les pigments majoritairement retrouvés chez ces microalgues sont la chlorophylle *a*, la violaxanthine et le β,β -carotène.

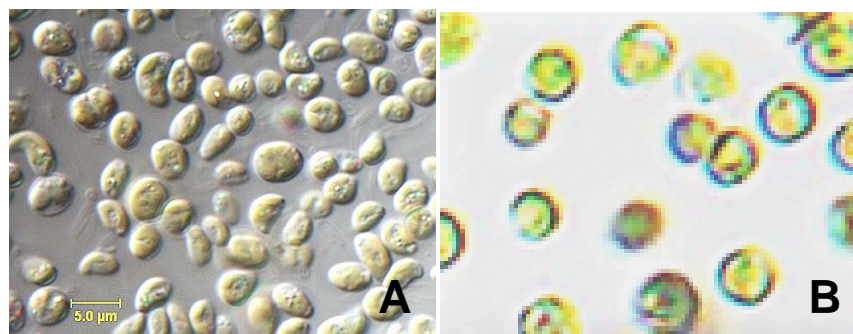


Figure 62 : Observation microscopique de *Nannochloropsis salina* (A)¹ et *Nannochloropsis oculata* (B)²

2.1.1.2 *Dunaliella tertiolecta*

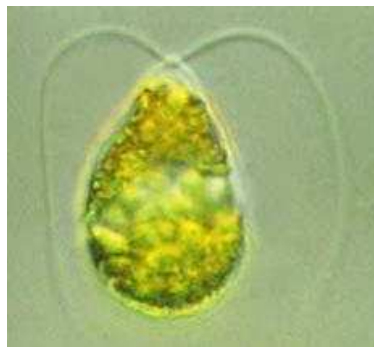


Figure 63 : Observation microscopique de *Dunaliella tertiolecta*³

¹ photographie de *Nannochloropsis salina* : www.sb-roscoff.fr

² photographie de *Nannochloropsis oculata* : www.algaedepot.com

³ photographie de *Dunaliella tertiolecta* : www.marinebiology.edu

Dunaliella tertiolecta appartient à la classe des Chlorophyceae. Les espèces appartenant au genre *Dunaliella* présentent une petite cellule (<20µm) dépourvue de frustule, couverte de cellulose, de xylandes, de mannanes et/ou de glycoprotéines, avec deux flagelles de taille identique insérés à l'apex de la cellule. Une observation microscopique de *D. tertiolecta* est présentée sur la figure 63.

Les chlorophycées appartiennent à la lignée verte. La chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* et le β,β-carotène sont les principaux pigments retrouvés. La néoxanthine, la violaxanthine et la lutéine sont présents mais minoritaires (Jeffrey *et al.*, 1997).

2.1.1.3 *Polypodochrysis teissieri*

Polypodochrysis teissieri appartient à l'embranchement des Ochrophyta et à la classe des Pinguiphyceae. La cellule est pourvue d'une paroi épaisse, elle possède un chloroplaste. Les Pinguiphyceae contiennent principalement de la chlorophylle *a* et *c*, de la fucoxanthine, de la violaxanthine, de la zéaxanthine et du β,β-carotène. La caractéristique principale de Pinguiphyceae est d'être exceptionnellement riche en acides gras oméga 3. La figure 64 est une observation microscopique de *P.teissieri* (de Reviere, 2002).



Figure 64 : Observation microscopique de *Polypodochrysis teissieri*¹

2.1.2 Conditions de culture des microalgues marines

Les conditions de culture des microalgues utilisées sont présentées dans le tableau 8. La culture des microalgues est réalisée à l'IFREMER de Nantes, au laboratoire PBA.

La matrice utilisée pour toutes les espèces est l'eau de mer, filtrée sur 0,2µm puis stérilisée. Les microalgues sont cultivées à 20°C, sans régulation de pH et en mode « batch ». *N. salina*, *N. oculata*, et *P. teissieri*, sont cultivées sous une irradiation lumineuse de 150 µmol.m⁻².s⁻¹ et pour un volume de 150 ml. *D. tertiolecta* est cultivée sous une irradiation de 180 µmol.m⁻².s⁻¹ et

¹ photographie de *Polypodochrysis teissieri* : http://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/partie1/chap3_50_ochrophyta.htm

dans un volume de 10 L. Aucune photopériode n'est appliquée pour chacune des espèces. *N. salina*, *N. oculata*, et *D. tertiolecta* sont cultivées dans du milieu de Conway (Walne 1970), *P. teissieri* est cultivée dans du milieu L1 (Guillard 1975).

Tableau 8 : Conditions de culture de *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella salina* et de *Polypodochrysis teissieri*

Espèce	<i>Nannochloropsis salina</i>	<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Polypodochrysis teissieri</i>
Souche	CCMP ⁽¹⁾ 1776	CCMP 525	CCMP 364	NBRC ⁽²⁾ 2806
Axénie de la souche	Non			
Type de culture	Batch			
volume de culture	150 ml	150 ml	10 l	150 ml
Matrice	Eau de mer (salinité 35.1) stérilisée sur 0.2µm puis autoclavée			
Milieu	milieu de Conway (Walne 1970)			milieu L1 (Guillard 1975)
Photopériode	aucune (lumière continue)			
Irradiance	150 µmol.m ⁻² .s ⁻¹	150µmol.m ⁻² .s ⁻¹	180 µmol.m ⁻² .s ⁻¹	150 µmol.m ⁻² .s ⁻¹
Température	20°C			
Régulation pH	non			
Méthode de concentration	centrifugation (4000g, 15 mn, 4°C)		centrifugation (4000g, 20 mn, 10°C)	centrifugation (4000g, 15 mn, 4°C)

⁽¹⁾CCMP : Culture collection of marine phytoplankton (Bigelow, U.S.A)

⁽²⁾NBRC : National Institute of Technology, Biological Resource Center (Japon)

Les microalgues sont collectées par centrifugation douce. *N. salina*, *N. oculata*, et *P. teissieri* sont centrifugées à 4000g, pendant 15 minutes à 4°C. Pour *D. tertiolecta* la centrifugation est réalisée à 4000g, pendant 20 minutes à 10°C. Les microalgues sont ensuite congelées à -20°C et envoyées sous cette forme au laboratoire LIENSs de l'Université de La Rochelle.

2.2 PREPARATION DES EXTRAITS DE MICROALGUES MARINES

2.2.1 Lyophilisation

A leur réception, les microalgues sont lyophilisées à -55°C et à une pression inférieure à 1 hPa. Le lyophilisateur utilisé est équipé d'un condenseur HetoLyoPro 3000 et d'un piège à glace Heto Cooling Trap (Therma Electron Corporation, France).

2.2.2 Contraintes liées à la recherche bioguidée de molécules à activité antiproliférative

Des extractions successives ont été réalisées dans des solvants de polarité croissante : dichlorométhane, éthanol et eau osmosée, afin de récupérer l'ensemble des molécules organiques, selon les recommandations du NCI.

2.2.3 Préparation des extraits de microalgues marines

Partie A : Préparation de l'extrait dichlorométhanique

Les molécules présentes dans les microalgues sont extraites par macération dans le solvant. Les microalgues marines sont mises en contact avec le solvant selon le ratio 1g de biomasse lyophilisée pour 100ml de dichlorométhane. La macération est réalisée à 20°C, pendant 2 h, sous agitation magnétique. Afin de préserver les pigments photosynthétiques de la photo-oxydation, l'extraction est réalisée à l'obscurité et sous atmosphère inerte d'argon. Après extraction, l'extrait obtenu est séparé des microalgues par filtration sur une membrane PVDF (Fluorure de polyvinylidène), 0,22 µm. La membrane sur laquelle se trouvent les microalgues marines est séchée pendant 24h, à l'obscurité à 4°C, afin de préserver les molécules présentes dans le marc. Le solvant du filtrat est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 45°C. L'extrait sec est conservé à 4°C, sous atmosphère inerte d'argon et à l'obscurité.

Partie B : Préparation de l'extrait éthanolique

Après extraction dans le dichlorométhane, le marc récupéré et séché est mis en contact avec de l'éthanol. Le volume de solvant utilisé est le même que pour l'extraction dichlorométhanique (si 100 ml de dichlorométhane ont été utilisés à l'étape précédente, 100 ml d'éthanol sont utilisés pour cette étape). L'extraction est réalisée à 20°C, pendant 2 h, sous agitation magnétique. Afin de préserver les pigments photosynthétiques de la photo-oxydation, l'extraction est réalisée à l'obscurité et sous atmosphère inerte d'argon. Après

extraction, l'extrait obtenu est séparé des microalgues par filtration sur une membrane PVDF, 0,22 µm. La membrane sur laquelle se trouvent les microalgues marines est séchée pendant 24h, à l'obscurité à 4°C. Le solvant du filtrat obtenu est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 45°C. L'extrait sec est conservé à 4°C, sous atmosphère inerte d'argon et à l'obscurité.

Partie C : Préparation de l'extrait aqueux

Après extraction dans l'éthanol, le marc récupéré et séché est mis en contact avec de l'eau osmosée. Le volume d'eau osmosée utilisé est le même que pour l'extraction dichlorométhanique et éthanolique (si 100 ml d'éthanol et de dichlorométhane ont été utilisés durant les étapes précédentes, 100 ml d'eau osmosée sont utilisés). L'extraction est réalisée à 20°C, pendant 2 h, sous agitation magnétique. Afin de préserver les pigments photosynthétiques de la photo-oxydation, l'extraction est réalisée à l'obscurité et sous atmosphère inerte d'argon.

L'extrait obtenu est séparé des microalgues par centrifugation de l'extrait à 8000 g durant 10 min à 20°C. Le surnageant est ensuite filtré sur membrane de nitrocellulose 1,22µm. Le filtrat obtenu est lyophilisé à une température de -55°C et à une pression inférieure à 1 hPa. Le lyophilisateur utilisé est équipé d'un condenseur HetoLyoPro 3 000 et d'un piège à glace Heto Cooling Trap (Therma Electron Corporation, France). Le lyophilisat est ensuite conservé à 4°C, sous atmosphère inerte d'argon et à l'obscurité.

2.3 EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE DES EXTRAITS DE MICROALGUES MARINES

2.3.1 Sélection des lignées cellulaires cancéreuses

Quatre lignées cellulaires cancéreuses ont été sélectionnées : deux lignées de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231), une lignée de cancer bronchique (A549) et une lignée de cancer de la prostate (LNCap). Un nombre conséquent de lignées pour cette étude permet de multiplier les possibilités de mettre en évidence un extrait intéressant. Les lignées cellulaires cancéreuses ne répondent pas de la même manière à une même molécule.

2.3.1.1 Les lignées cellulaires cancéreuses

MCF-7

La lignée MCF-7 est issue d'un adénocarcinome d'épithélium mammaire prélevé chez une patiente de 69 ans. MCF-7 est l'acronyme de Michigan Cancer Foundation - 7, en référence à l'institut de Détroit où la lignée a été établie -au septième essai-, en 1973, par l'équipe de Herbert Soule (Soule *et al.*, 1973). Elle est conservée dans la banque de lignées du NCI (réf. Collection ATCC (American Type Culture Collection) n°HTB-22). Cette lignée est sensible aux œstrogènes et aux ROS. La figure 65 est une observation microscopique ($\times 200$) de la lignée MCF-7, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.

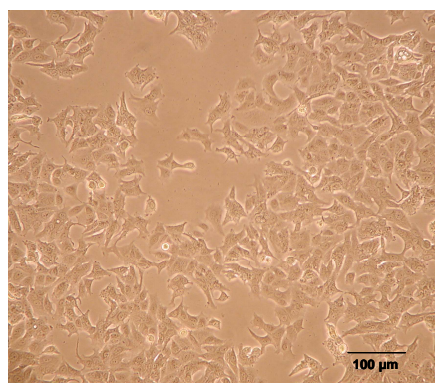


Figure 65 : Observation microscopique ($\times 200$) de la lignée MCF-7 en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide

MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 est issue d'un adénocarcinome d'épithélium mammaire prélevé chez une patiente de 51 ans. Elle est conservée dans la banque de lignées du NCI (réf. Collection ATCC n°HTB-26). Il s'agit d'une lignée aneuploïde avec un nombre de chromosomes proche de la triploïdie. Ces cellules sont insensibles aux oestrogènes et insensibles aux ROS. La figure 66 est une observation microscopique ($\times 200$) de la lignée MDA-MB-231, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.

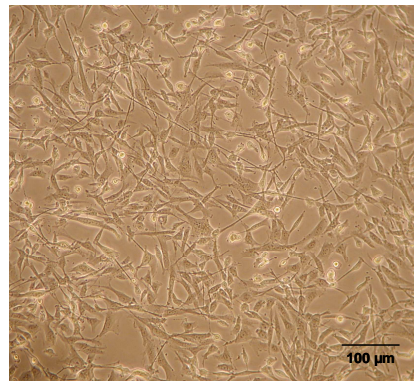


Figure 66 : Observation microscopique ($\times 200$) de la lignée MDA-MB-231 en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide

A549

La lignée A549 est issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire prélevé chez un patient de 58 ans (Giard *et al.*, 1973). Elle est conservée dans la banque de lignées du NCI (réf. Collection ATCC n°CCL-185). Il s'agit d'une lignée hypotriploïde qui possède 24% de cellules à 12 chromosomes, 22% à 64 chromosomes, les autres cellules étant diploïdes. La lignée est tumorigène chez la souris *nude* et a conservé le type sauvage du gène p53. La figure 67 est une observation microscopique ($\times 200$) de la lignée A549, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.

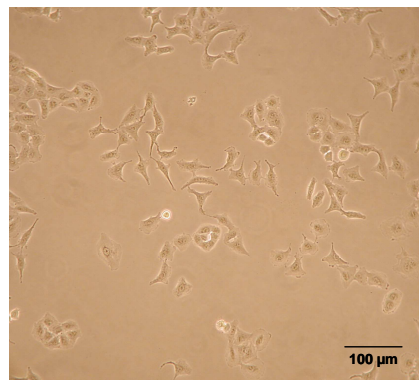


Figure 67 : Observation microscopique ($\times 200$) de la lignée A549 en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide

LNCap

La lignée LNCap est issue d'une biopsie du ganglion supraclaviculaire prélevée chez un homme âgé de 50 ans atteint d'un carcinome de prostate métastatique. Cette lignée est un modèle classique pour tester des anticancéreux. Un clonage de cette lignée a été réalisé (LNCap FGC). Il s'agit d'une lignée hypotétraploïde possédant 84 chromosomes. Son temps de doublement est de 34 heures *in vitro* (Cf. figure 5). La figure 68 est une observation microscopique ($\times 200$) de la lignée LNCap, dans son milieu de culture, fixée sur support solide (Photographie ATCC).

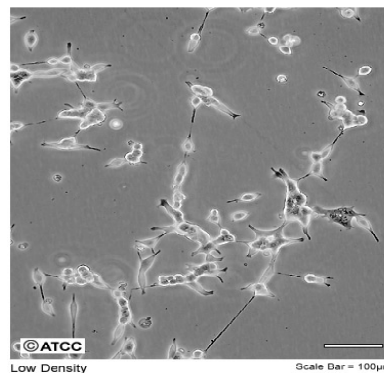


Figure 68 : Observation microscopique ($\times 200$) de la lignée LNCap en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide. (Photographie ATCC)

2.3.1.2 Entretien des différentes lignées cellulaires

Pour les lignées MCF-7, MDA-MB-231 et A549, les cellules sont cultivées en flasques à bouchon filtrant, 75 cm² dans 15 ml milieu de culture constitué de DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium) contenant 10% de SVF (Serum de Veau Fœtal) préalablement décomplémenté et de 1% d'antibiotiques (10000 U pénicilline.ml⁻¹ et 10 mg streptomycine.ml⁻¹). Pour la lignée LNCap, les cellules sont cultivées dans des flasques contenant le milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 contenant 10% de SVF, 1% d'antibiotiques.

Les cellules sont incubées à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours afin que les nutriments du milieu ne deviennent pas limitant pour le bon développement des cellules. De la trypsine (1X) est utilisée pour décrocher les cellules de leur support afin de procéder aux différentes expérimentations ou pour réaliser les repiquages.

Après récupération des cellules, la concentration cellulaire est déterminée par un comptage à la cellule de Mallassez. Toutes les expériences sont réalisées avec des cultures n'excédant pas 30 repiquages.

2.3.2 Evaluation de l'activité antiproliférative des extraits

L'activité antiproliférative des extraits est déterminée par l'utilisation du MTT (bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium). Ce test donne une indication du fonctionnement mitochondrial. Il consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus (Cf. figure 69). Après dissolution dans le DMSO (Diméthylsulfoxyde) des cristaux, une lecture spectrophotométrique est réalisée à 550 nm (Mosmann, 1983). Les absorbances obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes.

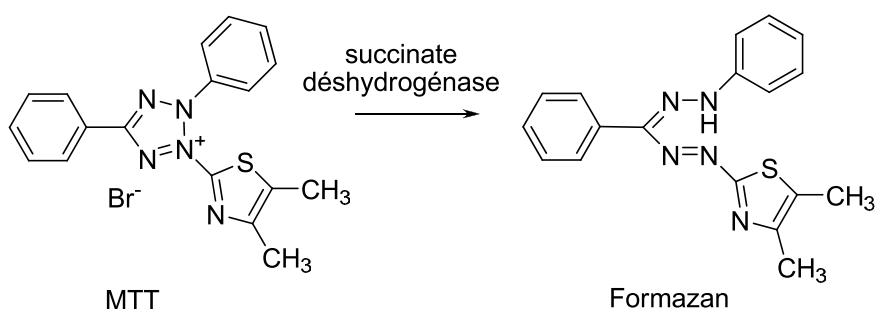


Figure 69 : Action de la succinate déshydrogénase sur le MTT. Coupure du cycle tétrazolium conduisant à la formation de cristaux de formazan

2.3.3 Protocole d'évaluation de l'activité antiproliférative des extraits

Etape 1 : Préparation des extraits

Afin d'évaluer l'activité antiproliférative et les CI_{50} (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) ; les extraits bruts sont testés à trois concentrations : $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ dans du milieu de culture cellulaire sur les différentes lignées cellulaires. La plus grande concentration testée est de $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Un extrait présentant une CI_{50} supérieure à cette valeur n'est pas un bon candidat pour mettre en évidence une molécule à activité antiproliférative.

Pour préparer ces solutions, les extraits secs sont dilués dans le milieu de culture cellulaire. Les extraits provenant de la macération dans le dichlorométhane et dans l'éthanol sont préalablement solubilisés dans du DMSO, car ils sont insolubles dans le milieu de culture. La teneur en DMSO dans les solutions à tester ne doit pas excéder 1%.

Etape 2 : dépôt des cellules en plaque 96 puits

Le test au MTT est réalisé en plaque 96 puits. Le milieu de culture contenant les cellules est déposé à hauteur de 50 μl dans chacun des puits (Cf. figure 48). Le nombre de cellules par puits pour chacune des lignées cellulaires utilisées est présenté dans le tableau 9. Les concentrations cellulaires utilisées sont différentes pour chacune des lignées, car elles ne présentent pas le même temps de génération.

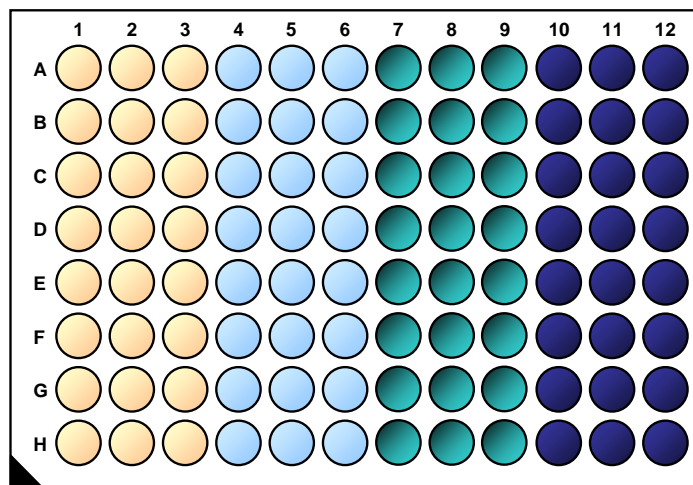
Tableau 9 : Concentration cellulaire utilisée pour évaluer le potentiel antiprolifératif des différents extraits, fractions et sous-fractions pour les lignées cellulaires MCF-7, LNCap, MDA-MB-231 et A549

	<i>Lignées cellulaires</i>			
	MCF-7	LNCap	MDA-MB-231	A549
Nombre de cellules par puits (50 μl)	3000	15000	5000	2000
Concentration cellulaire (cellules.ml⁻¹)	6.10^4	3.10^5	1.10^5	4.10^4

NB : le test est valable si les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Pour respecter la loi de Beer-Lambert, l'absorbance mesurée à 550 nm ne doit pas être supérieure à 2,5, pour tous les temps d'incubation. Le test a été préalablement paramétré pour chacune des lignées.

Etape 3 : Dépôts des extraits en plaques 96 puits

Pour chaque extrait, 50 μl des différentes dilutions sont déposés dans les plaques 96 puits selon le plan de la figure 70. Le volume final dans chacun des puits est donc de 100 μl . 24 puits ont été réalisés pour chacune des concentrations testées.



- 50 μ l de milieu de culture + 50 μ l de suspension cellulaire
- 50 μ l d'extrait à 10 μ g.ml⁻¹ + 50 μ l de suspension cellulaire
- 50 μ l d'extrait à 50 μ g.ml⁻¹ + 50 μ l de suspension cellulaire
- 50 μ l d'extrait à 100 μ g.ml⁻¹ + 50 μ l de suspension cellulaire

Figure 70 : Plan de dépôt des extraits et des cellules en plaque 96 puits pour l'évaluation du potentiel antiprolifératif des extraits microalgaux

Pour chacun des différents extraits (dichlorométhane, éthanol et eau), trois plaques 96 puits sont réalisées pour évaluer l'activité antiproliférative à 24, 48 et 72h. Les différentes plaques sont laissées à incuber pendant 24, 48, et 72h à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et à 95% d'humidité.

Etape 4 : Révélation de la croissance

Après le temps d'incubation voulu, 20 μ l de MTT à 5mg.l⁻¹ préparé dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH = 7,4 ; 0,1 M) sont déposés dans chacun des puits. Les plaques sont laissées à incuber pendant 5h à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et à 95% d'humidité.

Le milieu de culture est retiré, et les cristaux de formazan sont dissous dans le DMSO (200 μ l dans chacun des puits). L'absorbance dans chaque puits est mesurée à 550 nm par un lecteur de microplaques (Molecular Devices, Versa Max, tunable microplate reader).

Étape 5 : détermination des CI₅₀ (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire)

Les CI₅₀ sont calculées pour 72h d'incubation des cellules, en phase exponentielle de croissance. La détermination des CI₅₀ se fait en deux temps : Les pourcentages de croissance pour chacune des concentrations sont déterminés à partir de l'équation 1 :

$$\%_{croissance}^{Cx} = \frac{A_{550nm,72h}^{Cx}}{A_{550nm,72h}^T} \times 100$$

$\%_{croissance}^{Cx}$: Pourcentage de croissance des cellules en présence d'une concentration donnée en extrait.

$A_{550nm,72h}^{Cx}$: Absorbance mesurée à 550 nm après 72h d'incubation des cellules en présence d'une concentration donnée en extrait.

$A_{550nm,72h}^T$: Absorbance mesurée à 550 nm après 72h d'incubation des cellules en absence d'extrait (témoin).

Cx : concentration en extrait.

Équation 1 : Equation permettant de déterminer le pourcentage de croissance des différentes lignées cellulaires pour le test au MTT

La CI₅₀ est ensuite estimée graphiquement sur la courbe $\%_{croissance}^{Cx} = \text{Log}(C)$.

2.4 EXTRAITS A ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE : PURIFICATION BIOGUIDEE DES PRINCIPES ACTIFS

2.4.1 Démarche expérimentale

Après avoir évalué l'activité antiproliférative, les extraits présentant les CI_{50} les plus faibles sont sélectionnés. La démarche expérimentale est présentée sur la figure 71. Le but est de purifier par CLHP (Chromatographie Liquide Haute performance) et de caractériser la molécule portant l'activité. Une démarche bioguidée par fractionnement successif suivant l'activité affichée a été suivie.

Plusieurs fractions des extraits portant une activité antiproliférative sont réalisées. Les différentes fractions sont testées pour leur potentiel antiprolifératif. La ou les fractions portant l'activité sont de nouveau fractionnées. Cet algorithme se poursuit jusqu'à obtenir la ou les molécules portant l'activité.

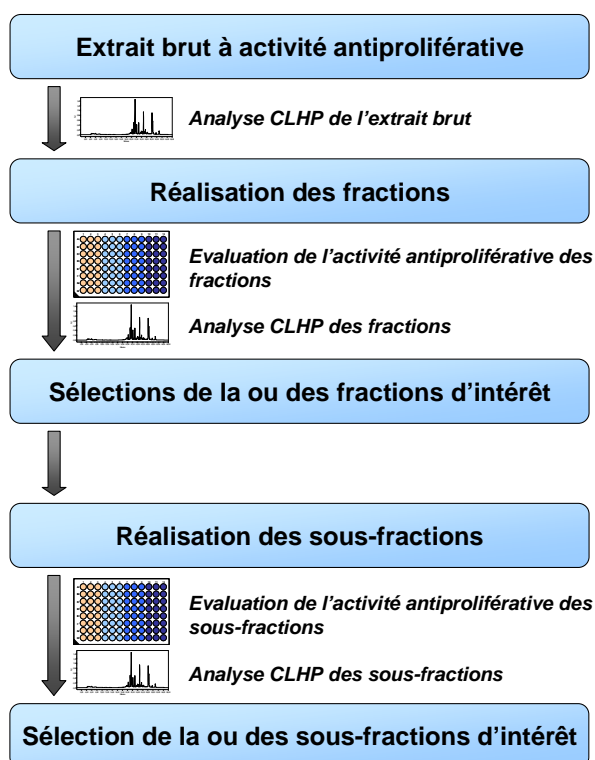


Figure 71 : Démarche expérimentale pour la purification bioguidée des principes actifs de microalgues marines

2.4.2 Analyse des extraits

Pour analyser les extraits, une CLHP équipée d'une pompe (Waters, W600), d'un injecteur (Waters, W717) et d'un détecteur PDA (Waters, W486) a été utilisée en phase inverse, avec une colonne analytique Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm x 4,6mm, 10 μm). Le PDA permet de détecter les molécules absorbant pour des longueurs d'onde comprises entre 190 et 600 nm. Le débit de la phase mobile est de 1ml.min⁻¹. Le gradient de solvant utilisé est dérivé de la méthode de Jeffrey *et al* et est présenté dans le tableau 10. Ce gradient est constitué de trois solvants : méthanol/eau (80/20), acétonitrile/eau (90/10) et acétate d'éthyle. Le volume injecté pour les différentes analyses est compris entre 10 à 50μl.

Tableau 10 : Colonnes et Gradients de solvants utilisés en CLHP analytique, semi-préparative et préparative

A : méthanol/eau (80/20)

B : acétonitrile/eau (90/10)

C : acétate d'éthyle

Colonne mode analytique : Phenomenex Luna C₁₈(2) (250 mm x 4,6 mm, 10 μm)

Colonne mode semi-préparatif : Phenomenex Luna C₁₈(2) (250 mm x 10,0 mm, 10 μm)

Colonne mode préparatif : Phenomenex Luna C₁₈(2) (250 mm x 21,2 mm, 10 μm)

Temps (min)	Débit (ml.min ⁻¹)			Solvants		
	Analytique	Semi-préparatif	Préparatif	%A	%B	%C
0	1	5	10	100	0	0
3	1	5	10	0	100	0
35	1	5	10	0	30	70
38	1	5	10	0	0	100
41	1	5	10	0	0	100
43	1	5	10	0	100	0
45	1	5	10	100	0	0
47	1	5	10	100	0	0

2.4.3 Purification des molécules d'intérêt

Afin de purifier les molécules qui présentent une activité antiproliférative, une CLHP est utilisée en mode préparatif ou semi-préparatif.

Après avoir déterminé les conditions analytiques, le passage de la CLHP au mode semi-préparatif ou préparatif est réalisé. Les seuls changements par rapport au mode analytique sont le débit et la colonne. Les différents paramètres utilisés sont présentés dans le tableau 10. Les volumes injectés vont de 100 à 500 µl en mode semi-préparatif et de 500 à 1000µl en mode préparatif.

Après avoir récupéré les fractions, le solvant est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C. Puis, les échantillons sont lyophilisés afin d'éliminer les traces d'eau.

2.5 CARACTERISATION DES MOLECULES PURIFIEES A ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE

2.5.1 Spectrométrie de masse haute résolution

L'analyse des molécules purifiées en spectrométrie de masse haute résolution permet de déterminer le poids moléculaire d'une molécule purifiée. Lorsqu'une molécule connue est suspectée, l'analyse en spectrométrie de masse haute résolution permet de confirmer sa présence ou son absence dans l'échantillon.

Les molécules purifiées sont envoyées sous forme de poudre (préalablement lyophilisées) au « Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest » (CRMPO) à Rennes. Elles sont analysées par un Spectromètre de masse Bruker MicrO-Tof-Q 2 composé de deux quadrupôles et d'un analyseur orthogonal à temps de vol et, équipé de sources electrospray ou APCI. Dans le cas de cette étude, la source utilisée est l'electrospray (ESI) et le solvant d'analyse est CH₂Cl₂/CH₃OH (90/10).

2.5.2 Spectre d'absorption de la ou des molécules purifiées

Une analyse CLHP est réalisée, afin de vérifier la pureté des molécules isolées. Lors de cette analyse, le spectre d'absorption de la molécule est mesuré pour des longueurs d'onde allant de 190 à 600 nm. Il donne des indications quant à la nature de la molécule purifiée.

2.6 EVALUATION DE L'ACTIVITE CYTOSTATIQUE

Après avoir purifié une molécule présentant une activité antiproliférative intéressante, la seconde étape est d'évaluer l'activité cytostatique de cette dernière.

2.6.1 Principe et protocole

Pour mettre en évidence l'activité cytostatique d'une molécule pure, des croissances discontinues des lignées cellulaires d'intérêt ont été réalisées en présence de la molécule purifiée. Dans un premier temps les cellules sont mises en contact avec la molécule à tester pendant 72h, puis le milieu contenant la molécule est remplacé par du milieu de culture neuf. Après l'ajout du milieu de culture neuf, la croissance cellulaire est évaluée à 0, 24 et 48h selon le protocole du test au MTT. Si les cellules reprennent leur croissance, la molécule est considérée comme non cytostatique. Dans le cas contraire, la molécule est considérée comme cytostatique. Une molécule peut également devenir cytostatique à partir d'une certaine dose. Les différentes concentrations cellulaires utilisées pour ce test sont indiquées dans le tableau 11.

NB : le test est valable si les cellules sont en phase exponentielle de croissance lors de la lecture. Pour respecter la loi de Beer-Lambert, l'absorbance mesurée à 550 nm ne doit pas être supérieure à 2,5. Le test a été préalablement paramétré pour chacune des lignées.

Tableau 11 : Concentration cellulaire utilisée pour évaluer le potentiel cytostatique de molécules isolées pour les lignées cellulaires MCF-7 et A549

Lignée cellulaire	Nombre de cellules par puits (50 µl)	Concentration cellulaire (cellules.ml ⁻¹)
MCF-7	1500	3.10 ⁴
A549	700	1,4.10 ⁴

NB : Les concentrations de molécules purifiées à tester dépendent des CI₅₀ obtenues pour chacune des lignées cellulaires étudiées.

2.7 EVALUATION DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE

2.7.1 Principe

Afin de mettre en évidence l'activité cytotoxique d'une molécule pure, un test de viabilité peut-être réalisé. Le pourcentage de cellules mortes dans un échantillon donné est déterminé à l'aide du bleu trypan qui pénètre seulement dans les cellules mortes. Lors d'un comptage à la cellule de Mallasez, le pourcentage de cellules marquées au bleu trypan par rapport aux cellules non marquées permet de déterminer la mortalité cellulaire.

2.7.2 Protocole

Etape 1 : Mise en culture des cellules

Les cellules sont mises en culture dans des flasques à bouchon filtrant de 25 cm² à une concentration cellulaire de $5 \cdot 10^6$ cellules.ml⁻¹, dans 5 ml de milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 24h.

Etape 2 : Croissance en présence de la molécule à tester

Après 24h d'incubation, le milieu de culture est retiré et est remplacé par 5 ml de milieu contenant la molécule purifiée à la concentration étudiée. Un témoin est également réalisé. Les cellules sont incubées pendant 72h.

Etape 3 : Comptage à la cellule de Mallasez et marquage au bleu trypan

Après 72h d'incubation le milieu de culture est retiré et les cellules sont récupérées. Ensuite, les cellules sont mises en contact avec du bleu trypan en solution dans du PBS (pH 7,4). La concentration finale en bleu trypan est de 0,2%. La concentration cellulaire est ensuite déterminée à la cellule de Mallasez et le pourcentage de cellules mortes est déterminé par comptage des cellules colorées par le bleu trypan.

2.8 EVALUATION DE L'ACTIVITE APOPTOTIQUE

Une des activités recherchées chez une molécule anticancéreuse est sa capacité à provoquer l'apoptose chez la cellule cancéreuse. Les altérations de la membrane cellulaire ainsi que la fragmentation de l'ADN génomique sont des modifications caractéristiques survenant lors de l'apoptose. Ces modifications sont recherchées afin de mettre en évidence le potentiel pro-apoptotique de la ou des molécules purifiées à activité antiproliférative.

2.8.1 Altération de la membrane plasmique

2.8.1.1 Principe

Lors des stades précoces de l'apoptose, des altérations apparaissent au niveau de la membrane cellulaire. Une de ces altérations concerne les phosphatidylsérines (Ps) de la membrane plasmique. Les Ps sont normalement exposées du côté interne de la bicouche lipidique. A l'initiation de l'apoptose, les Ps subissent une translocation du côté interne vers le coté externe de la membrane plasmique. Les Ps sont exposées vers le milieu extracellulaire, ce qui permet leur détection. L'Annexine-V, protéine de liaison aux Ps, Ca²⁺-dépendante, est utilisée pour les détecter.

Les cellules nécrotiques sont également marquées par l'Annexine-V, car lors de la nécrose la membrane plasmique perd son intégrité. Les Ps sont donc exposées également à l'Annexine-V. L'utilisation d'un marqueur de l'ADN pénétrant seulement dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire permet de différencier les cellules nécrotiques des cellules apoptotiques. Les cellules apoptotiques sont marquées par l'Annexine-V et les cellules nécrotiques sont marquées par l'AnnexineV et par le marqueur d'ADN.

2.8.1.2 Protocole

Etape 1 : Mise en culture des cellules

Les cellules sont mises en culture dans des chambres d'incubation (sur lame prévue pour la microscopie) à une concentration cellulaire de 1.10^4 cellules.ml⁻¹, dans 1 ml de milieu de culture. Les cellules sont incubées durant 24h.

Etape 2 : Croissance en présence de la molécule à tester

Après 24h d'incubation, le milieu de culture est retiré et est remplacé par 1 ml de milieu contenant la molécule purifiée à la concentration étudiée. Un témoin est également réalisé. Les cellules sont incubées pendant 48h.

Etape 3 : Marquage des cellules à l'Annexine-V

Après 48h d'incubation le milieu de culture est retiré, les cellules sont rincées avec du tampon d'incubation (10Mm Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCL, 5mM CaCl₂). Ensuite, les cellules sont mises en contact pendant 15 minutes à 20°C avec 1 ml de la solution de marquage (contenant l'Annexine-V et le marqueur d'ADN BOBO-1).

Etape 4 : Analyse

La solution de marquage est retirée, les cellules sont ensuite rincées avec 1ml de tampon d'incubation (10Mm Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCL, 5mM CaCl₂).

Les chambres d'incubation sont retirées et la lame est observée en microscopie à fluorescence. Le marqueur des Ps est l'AnnexineV-Alexa 568. L'Alexa 568 est un marqueur fluorescent qui est excité pour des longueurs d'onde comprises entre 488 et 596 nm et réémet à des longueurs d'onde proches de 600 nm. Le marqueur d'ADN est le BOBO-1. Ce marqueur d'ADN fluorescent est excité à 462 nm et réémet à 481 nm. Les cellules nécrotiques apparaissent avec un double marquage (rouge et vert) alors que les cellules apoptotiques apparaissent avec un simple marquage (rouge).

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 RESULTATS DE LA RECHERCHE BIOGUIDEE

3.1.1 Sélection des extraits d'intérêt

Tableau 12 : CI_{50} en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des différents extraits testés sur les lignées cellulaires cancéreuses utilisées. Avec, Aq : extrait aqueux, EtOH : extrait éthanolique, DCM : extrait dichlorométhanique

Lignée cellulaire	Type d'extrait	Espèces de microalgues étudiées			
		<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Nannocloropsis oculata</i>	<i>Nannocloropsis salina</i>	<i>Polypodochrysis teissieri</i>
A549	Aq	>	>	-	>
	EtOH	>	-	-	-
	DCM	>	-	-	-
MCF-7	Aq	>	>	-	19,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
	EtOH	61,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	-	-	-
	DCM	56,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	>	-	-
MDA-MB-231	Aq	>	>	-	>
	EtOH	>	>	-	-
	DCM	>	72,8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	-	-
LNcap	Aq	>	-	>	-
	EtOH	>	-	>	-
	DCM	60,9 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	-	>	-

- extrait non testé

> CI_{50} supérieur à $100\mu\text{g.ml}^{-1}$

extrait sélectionné

extrait sélectionné en attente de purification du principe actif

Le tableau 12 présente les CI_{50} obtenues pour les extraits sur les différentes lignées cellulaires étudiées. Certains extraits obtenus en trop faible quantité n'ont pu être testés.

L'extrait aqueux de *P. teissieri* présente la plus faible CI_{50} ($19,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur la lignée MCF-7). L'extrait Dichlorométhanique de *D. tertiolecta* présente des CI_{50} respectivement de 52,7 et $60,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour la lignée MCF-7 et la lignée LNCap. L'extrait éthanolique de *D. tertiolecta* présente une CI_{50} de $61,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur la lignée MCF-7. Enfin l'extrait Dichlorométhanique de *N. oculata* a une CI_{50} de $72,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur la lignée MDA-MB-231.

L'extrait le plus prometteur (extrait aqueux de *P. teissieri*) n'a pas fait l'objet d'investigations supplémentaires, en raison de l'indisponibilité de la microalgue en assez grande quantité pour la purification du ou des principes actifs.

L'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta* présente une activité antiproliférative sur deux lignées cellulaires cancéreuses (MCF-7 et LNCap). La recherche bioguidée de molécules anticancéreuses sera réalisée sur cet extrait. La lignée MCF-7 a été préférée à la lignée LNCap pour la recherche bioguidée. Elle répond mieux à cet extrait et présente un temps de génération plus rapide.

Un extrait brut est intéressant lorsque les CI_{50} sont inférieures à $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Kornprobst, 2005). L'extrait brut de *D. tertiolecta* ne correspond pas à ce critère. Cependant, un extrait est un mélange complexe, et le composé actif peut être une molécule minoritaire du mélange. De plus, les résultats doivent être exprimés en $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pour se prononcer sur le potentiel antiprolifératif d'une molécule, le composé actif pouvant être de haut poids moléculaire.

3.1.2 Sélection des fractions d'intérêt de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta*

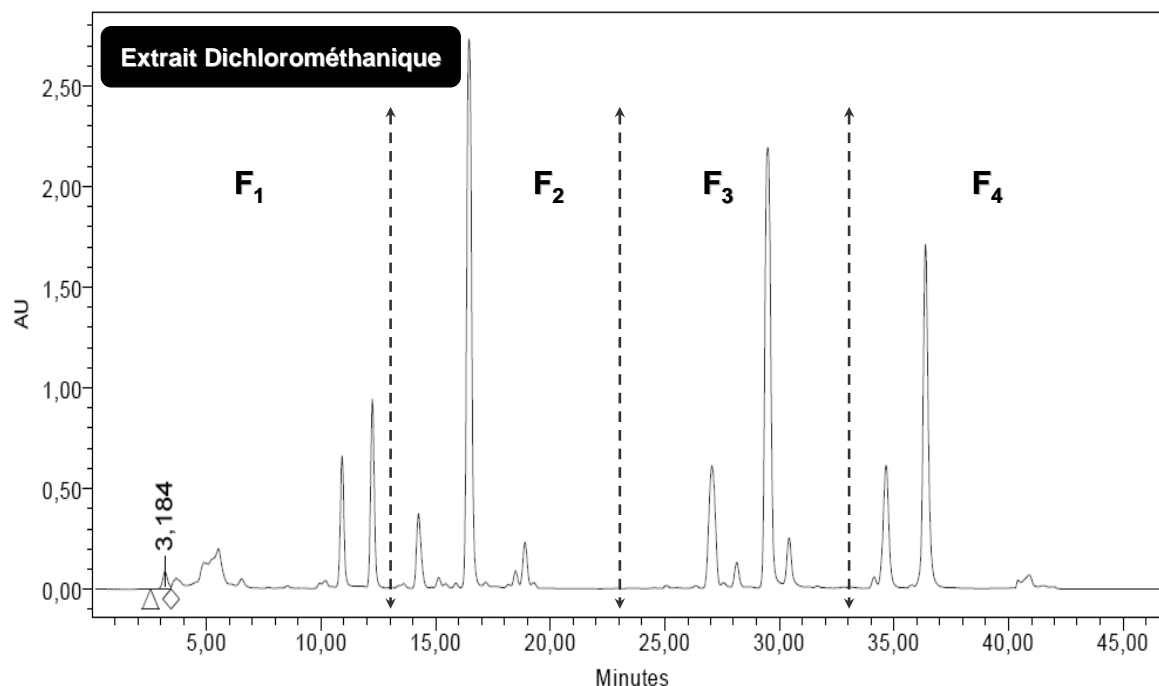


Figure 72 : Chromatogramme de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta*, à 435nm, en mode semi-préparatif. F₁, F₂, F₃ et F₄ représentant les différentes fractions réalisées pour cet extrait

La figure 72 présente le chromatogramme à 435 nm, obtenu en mode semi-préparatif, de l'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta*. L'extrait a été fractionné selon le plan apparaissant sur le chromatogramme de la figure 72. Ce plan de fractionnement a été défini selon les critères suivants :

- le volume de phase mobile récupéré pour chacune des fractions doit être équivalent,
- de nombreux pics minoritaires sont co-élus. Le passage d'une fraction à une autre est réalisé pour des temps où aucune molécule n'est détectée.

Les quatre fractions obtenues ont ensuite été évaluées pour leur activité antiproliférative sur la lignée MCF-7.

Tableau 13 : CI_{50} en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ des différentes fractions de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta* testées sur la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7. Avec Fn : fraction d'extrait

Fractions de l'extrait dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i>		F₁	F ₂	F ₃	F ₄
Lignée cellulaire : MCF-7	CI_{50}	14,3	>	>	>
	($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)				

> : CI_{50} supérieure à $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

: Fraction sélectionnée

Le tableau 13 présente les CI_{50} des différentes fractions de l'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta* pour la lignée cellulaire MCF-7. Les fractions ont été testées à des concentrations de $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

La fraction F₁ présente une CI_{50} de $14,3\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Les CI_{50} des autres fractions sont supérieures à $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

F₁ présente une activité antiproliférative significative sur la lignée MCF-7. Ce résultat indique que l'activité de l'extrait pour la lignée MCF-7 est concentrée dans cette fraction. La recherche bioguidée se poursuit sur F₁.

3.1.3 Sélection des sous-fractions d'intérêt de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta*

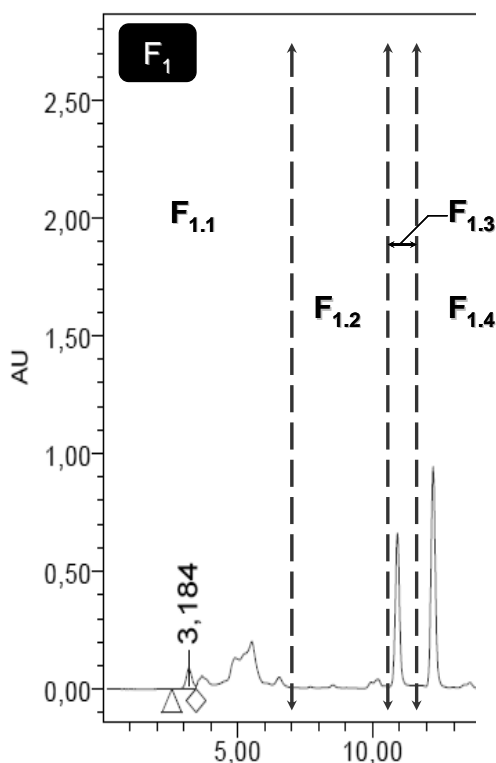


Figure 73 : Chromatogramme de la fraction F_1 de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta*, à 435nm, en mode semi-préparatif. $F_{1.1}$, $F_{1.2}$, $F_{1.3}$ et $F_{1.4}$ représentant les différentes sous-fractions réalisées pour cet extrait

NB : Temps (minutes) en abscisses du chromatogramme

La figure 73 présente le chromatogramme à 435 nm, obtenu en mode semi-préparatif, de la fraction F_1 de l'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta*. F_1 a été fractionnée selon le plan apparaissant sur le chromatogramme de la figure 73. Ce plan de fractionnement a été défini selon les critères suivants :

- Certains pics (ou molécules) sur le chromatogramme présentent une bonne résolution ou séparation. Les pics isolés constituent une fraction, ce qui est le cas pour les sous-fractions $F_{1.3}$ et $F_{1.4}$.
- De nombreux pics minoritaires sont co-élus ($F_{1.1}$). Le passage d'une sous-fraction à une autre est réalisé pour des temps où aucune molécule n'est détectée.

Les quatre sous-fractions obtenues sont évaluées pour leur activité antiproliférative sur la lignée MCF-7.

Tableau 14 : CI_{50} en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ des différentes sous-fractions de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta* testées sur MCF-7. Fn : fraction d'extrait

Sous- fraction de l'extrait Dichlorométhanique de <i>Dunaliella tertiolecta</i>		F _{1.1}	F _{1.2}	F _{1.3}	F _{1.4}
Lignée cellulaire : MCF-7	CI_{50} ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	>	20,5	18,9	11,7
Ecart à la moyenne	+ /-		2,2	8,85	0,2

> CI_{50} supérieure à $50\mu\text{g.ml}^{-1}$

Fraction sélectionnée

Le tableau 14 présente les CI_{50} des différentes sous-fractions de l'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta* pour la lignée cellulaire MCF-7. Les sous-fractions ont été testées à des concentrations de $50\mu\text{g.ml}^{-1}$, $40\mu\text{g.ml}^{-1}$, $10\mu\text{g.ml}^{-1}$ et $2\mu\text{g.ml}^{-1}$. La concentration de $100\mu\text{g.ml}^{-1}$ n'est plus testée, car la fraction F₁ présente une CI_{50} de $14,3\mu\text{g.ml}^{-1}$.

La sous-fraction F_{1.4} a une CI_{50} de $11,7 \pm 0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$. Les sous-fractions F_{1.2} et F_{1.3}, présentent des CI_{50} respectivement de $20,5 \pm 2,2\mu\text{g.ml}^{-1}$ et $18,9 \pm 8,85\mu\text{g.ml}^{-1}$. F_{1.1} montre une CI_{50} supérieure à $50\mu\text{g.ml}^{-1}$. Les sous-fractions F_{1.3} et F_{1.4} présentent les meilleures activités antiprolifératives sur la lignée MCF-7. Les mesures réalisées sur F_{1.4} bénéficient d'une meilleure répétabilité (écart à la moyenne $\pm 0,2\mu\text{g.ml}^{-1}$). L'étude se poursuit sur cette sous-fraction F_{1.4}.

3.1.4 Résultats de la recherche bioguidée

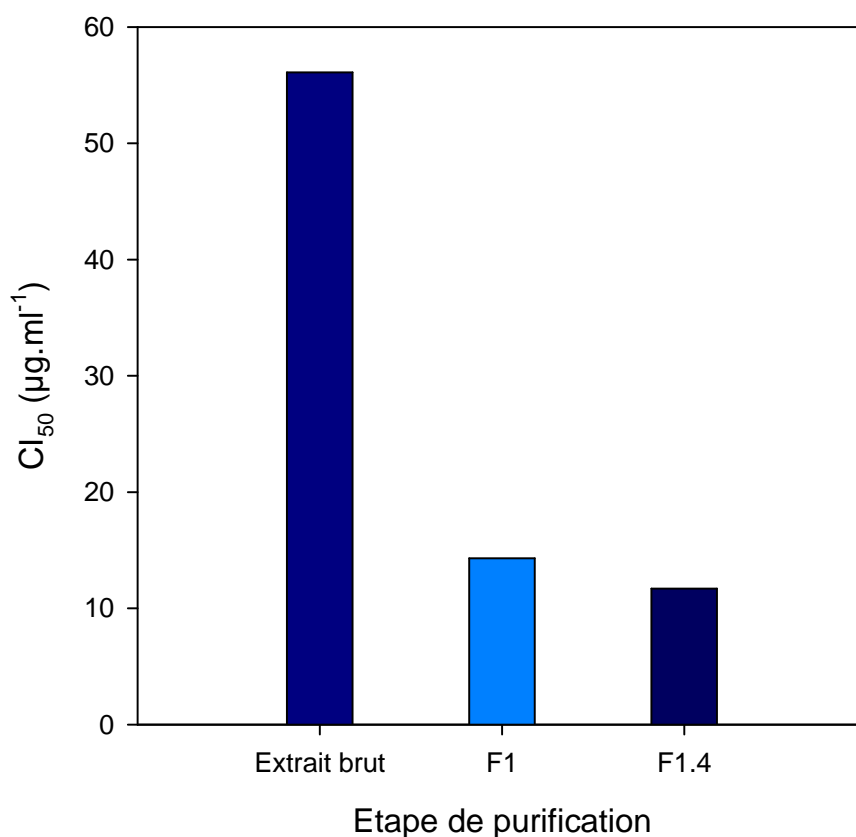


Figure 74 : CI_{50} en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta*, de sa fraction F_1 et de sa sous-fraction $F_{1.4}$ sur la lignée cellulaire MCF-7

La figure 74 présente les CI_{50} en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour l'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta*, de la fraction F_1 et de la sous-fraction $F_{1.4}$, sur la lignée cellulaire MCF-7. Les CI_{50} diminuent en fonction des étapes de purification. Ce résultat signifie que l'activité antiproliférative mesurée dans l'extrait brut de départ n'est pas due à un phénomène de synergie d'action entre les différentes molécules du mélange. Un phénomène de synergie aurait conduit à une augmentation des CI_{50} au fur et à mesure des étapes de purification.

3.2 CARACTERISATION DU PRINCIPE ACTIF DE LA SOUS FRACTION F1.4 DE L'EXTRAIT DICHLOROMETHANIQUE DE *DUNALIELLA TERTIOLECTA*

3.2.1 Résultat de la purification

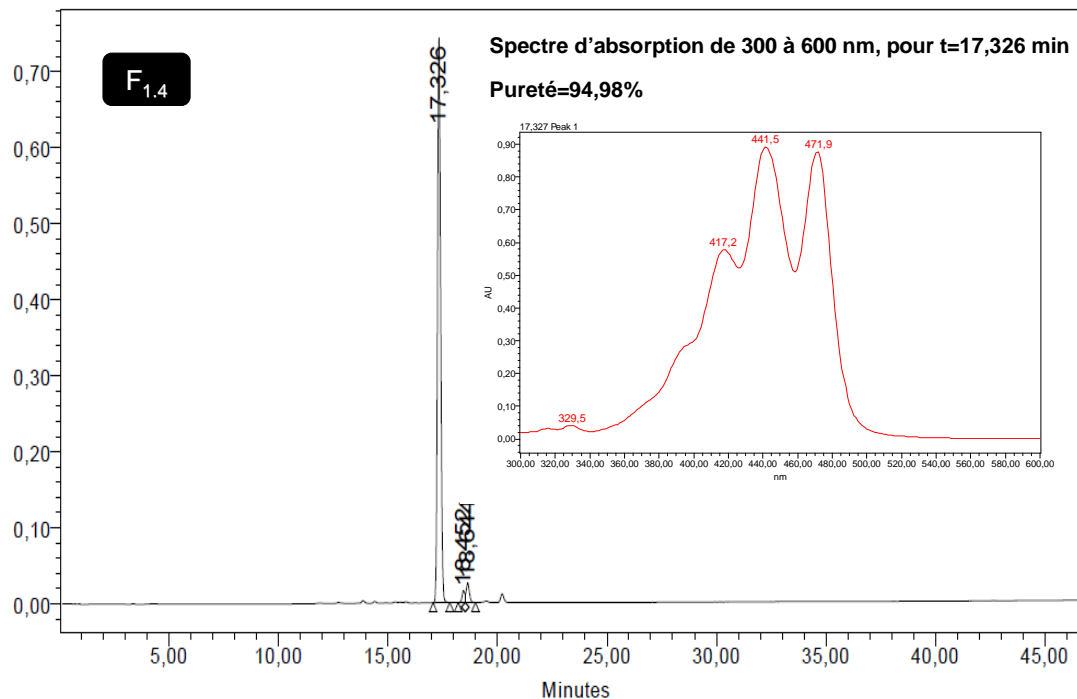


Figure 75 : Chromatogramme de F_{1.4} de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta* à 435 nm, en mode analytique. Pureté et spectre d'absorption pour la molécule t=17,326 min

La figure 75 présente le chromatogramme à 435 nm de la sous-fraction F_{1.4} de l'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta*. Le chromatogramme indique que la fraction F_{1.4} est constituée de trois molécules, correspondant à un pic majoritaire et à deux pics minoritaires. La molécule présentant le temps de rétention relatif ($t_r - t_0$) de 13,963 min est majoritaire et constitue 94,98% de la sous-fraction. Le spectre d'absorption de la molécule majoritaire présente trois bandes d'absorption maximale ce qui est caractéristique des molécules de la famille des caroténoïdes (Jeffrey *et al.*, 1997). La sous-fraction F_{1.4} a été analysée en spectrométrie de masse haute résolution.

3.2.2 Caractérisation de la molécule

3.2.2.1 Spectrométrie de masse haute résolution

Tableau 15 : Conditions expérimentales et résultats obtenus pour la sous-fraction F_{1,4} en spectrométrie de masse haute résolution

Appareil : Spectromètre de masse Bruker MicrO-Tof-Q 2	
Source : ESI	Composé principal
Solvant : CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH : 90/10	
Formule brute	[M+Na] ⁺ (C ₄₀ H ₅₆ O ₄ Na)
Masse Théorique	623.40763
z	1
m/z Théorique	623.40708
m/z Trouvé	623.4068 (0 ppm)

Le tableau 15 présente les conditions expérimentales et résultats obtenus, en spectrométrie de masse haute résolution, pour la sous-fraction F_{1,4}. La formule brute de la molécule majoritaire contenue dans la sous-fraction est C₄₀H₅₆O₄.

Quatre pigments caroténoïdes issus de microalgues marines possèdent cette formule brute (Jeffrey *et al.*, 1997):

- la violaxanthine.
- la néoxanthine,
- la prasinoxanthine
- la siphonaxanthine

La RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) n'a pas pu être réalisée en raison de la quantité de molécule purifiée (<1mg). En absence de cet outil, une analyse du spectre d'absorption de la molécule majoritaire de F_{1,4} a été réalisée.

3.2.2.2 Etude du spectre d'absorption du caroténoïde contenu F_{1,4}

L'étude du spectre d'absorption d'un caroténoïde donne des indications quant à son identité. Pour la plupart des caroténoïdes, les longueurs d'onde maximales d'absorption correspondent à des bandes d'absorption maximales notées bandes I, II et III. Les valeurs de ces longueurs d'onde maximales sont spécifiques pour chaque xanthophylle dans des conditions données.

A partir de ces bandes d'absorption, le ratio en pourcentage des bandes III sur II (% III/II) est calculé. La valeur du ratio est spécifique d'un pigment caroténoïde dans des conditions données (Jeffrey *et al.*, 1997). La figure 76 présente un exemple de cette analyse pour le lycopène.

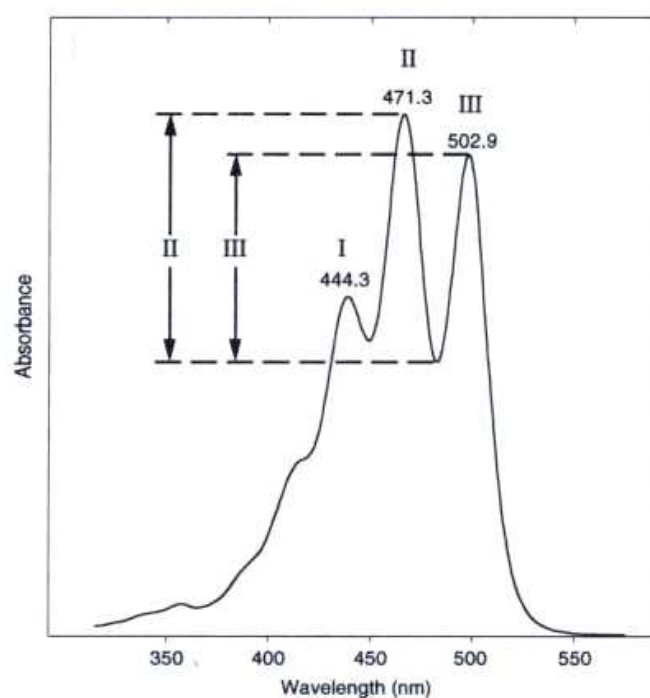
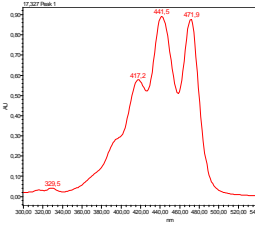
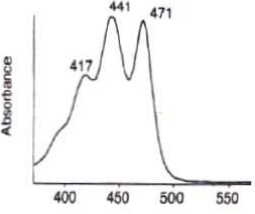
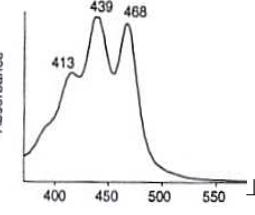
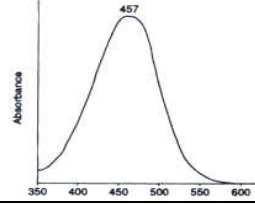
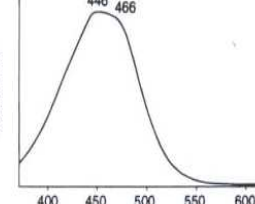


Figure 76 : Analyse du ratio bande III/II pour le lycopène (Jeffrey *et al.*, 1997)

Les valeurs obtenues pour la molécule majoritaire de la sous-fraction F_{1,4} sont comparées à celles obtenues par Jeffrey *et al* (1997).

NB : le gradient CLHP utilisé dérive de celui de Jeffrey et al (1997), les temps d'élution sont modifiés, mais les solvants utilisés sont les mêmes. La comparaison des ratios bandes % III/II est donc pertinente.

Tableau 16 : Comparaison des spectres d'absorption et des longueurs d'onde maximales d'absorption obtenus expérimentalement pour la sous-fraction F_{1.4} et les données bibliographiques de Jeffrey *et al* (1997), pour la violaxanthine, la néoxanthine, la prasinoxanthine et la siphonaxanthine

Echantillon et pigments caroténoïdes		Spectre d'absorption de 300 à 600 nm	Longueur d'onde maximale d'absorption (nm)	Ratio bande % III/II
Données expérimentales	F_{1.4}		417,2 441,5 471,9	96
Données bibliographiques (Jeffrey <i>et al.</i>, 1997)	violaxanthine		417 441 471	93
	néoxanthine		413 439 468	87
	prasinoxanthine		457	
	siphonaxanthine		446 466	

Les spectres d'absorption et les ratios des bandes III sur II (% III/II) fournis par la monographie de Jeffrey *et al* (1997) de la violaxanthine, la néoxanthine, la prasinoxanthine et la siphonaxanthine sont présentés dans le tableau 15. Ils sont comparés au spectre d'absorption et au ratio % III/II de F_{1.4}.

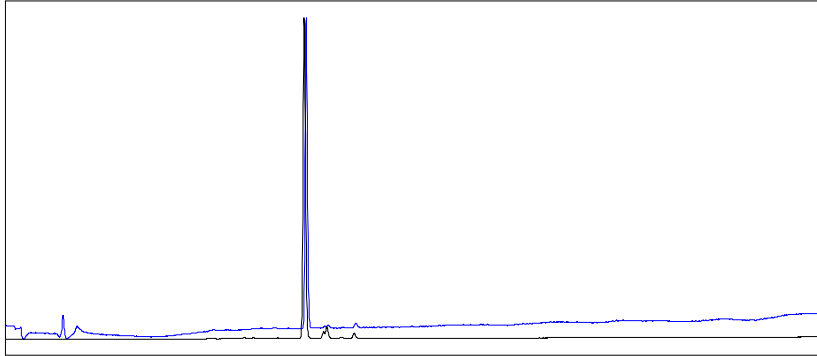
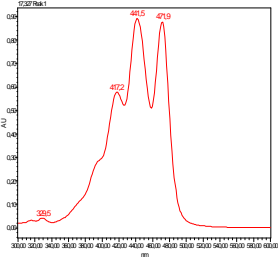
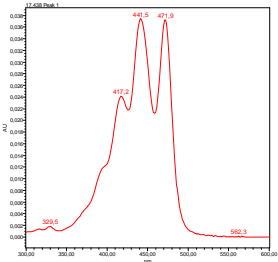
Le tableau 16 montre que les spectres d'absorption de la prasinoxanthine et de la siphonaxanthine ont une allure différente de celui obtenu pour F_{1.4}. Les longueurs d'onde maximales d'absorption sont de 457 nm pour la prasinoxanthine et de 446 et 466 nm pour la siphonaxanthine. Pour ces deux pigments le % III/II n'est pas calculable. La violaxanthine et la néoxanthine ont un spectre qui présente la même allure que F_{1.4}. Les longueurs d'onde maximales d'absorption pour la violaxanthine et la néoxanthine sont respectivement de 417, 441, 471 nm et 413, 439, 468 nm. Les % III/II sont respectivement de 93% et de 87%. Les valeurs des longueurs d'onde maximales d'absorption pour F_{1.4} sont de 417,2, 441,5 et 471,9 nm et le % III/II est de 96%.

Cette comparaison indique que la molécule contenue dans F_{1.4} n'est ni la prasinoxanthine, ni la siphonaxanthine. Ce résultat est confirmé par les données bibliographiques. Ces deux pigments ne sont pas présents chez les microalgues de la classe des Chlorophyceae (Jeffrey *et al.*, 1997)

La néoxanthine et la violaxanthine sont retrouvées chez *D. tertiolecta*. La comparaison effectuée entre les données expérimentales et les données bibliographiques indique que le pigment purifié a des longueurs d'onde maximales d'absorption proches de celles de la violaxanthine. La même observation est faite pour le % III/II. Ces correspondances ne sont pas retrouvées pour la néoxanthine. L'identification par comparaison entre les valeurs expérimentales et les données bibliographiques donne une indication quant à l'identité de la molécule. Un étalon commercial de violaxanthine sert d'authentique et est comparé à F_{1.4} par analyse en CLHP.

3.2.2.3 Comparaison avec un étalon commercial de violaxanthine

Tableau 17 : Comparaison des chromatogrammes à 435 nm, en mode analytique, de la sous-fraction F_{1,4} de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta*, et d'un étalon commercial de violaxanthine. Comparaison des spectres d'absorption et des longueurs d'onde maximales d'absorption obtenues expérimentalement pour la sous-fraction F_{1,4} et pour la violaxanthine commerciale

Données expérimentales : Obtenues selon la méthode analytique décrite dans le tableau 5				
Chromatogrammes à 435 nm de :				
<ul style="list-style-type: none"> - La fraction F_{1,4} (noir) - en solution dans l'éthanol absolu - La violaxanthine commerciale (bleue)- p=97,3 %, 1,010mg.l⁻¹.En solution dans l'éthanol absolu - Chromadex. 				
				
Echantillons	Temps de rétention (min)	Spctre d'absorption de 300 à 600 nm	Longueur d'onde maximale d'absorption (nm)	Ratio bande % III/II
F _{1,4}	13,963		417,2 441,5 471,9	96
Violaxanthine Commerciale	14,047		417,2 441,5 471,9	98

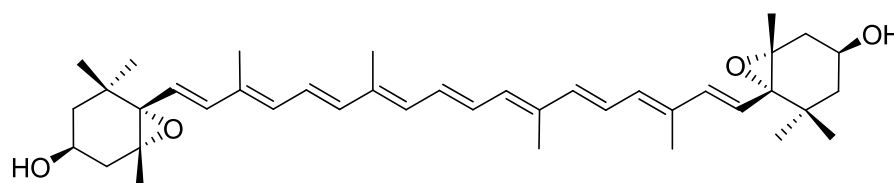
Le tableau 17 est une comparaison entre les analyses CHLP effectuées en mode analytique à 435 nm pour F_{1.4} et pour un étalon commercial de violaxanthine, p=97,3 %, 1,010mg.l⁻¹ - Chromadex. Les deux échantillons sont en solution dans de l'éthanol absolu. La première partie du tableau est une superposition des chromatogrammes obtenus. Les temps de rétentions sont respectivement de 13, 963 minutes et de 14,047 minutes pour F_{1.4} et l'étalon commercial. Ce résultat indique que les échantillons ont la même polarité.

La seconde partie du tableau est une comparaison des spectres d'absorption, des longueurs d'onde maximales d'absorption et des % III/II obtenues expérimentalement pour F_{1.4} et la violaxanthine commerciale. Les valeurs des longueurs d'onde maximales d'absorption pour F_{1.4} sont de 417,2, 441,5 et 471,9 nm et le % III/II est de 96%. L'étalon commercial de violaxanthine a des longueurs d'onde maximales d'absorption de 417,2, 441,5 et 471,9 nm et un % III/II de 98%.

Ces résultats indiquent que la molécule majoritaire contenue dans la sous-fraction F_{1.4} est la violaxanthine. La figure 77 présente sa structure chimique.

La violaxanthine est un pigment de la classe des caroténoïdes, de formule brute C₄₀H₅₆O₄, avec deux fonctions époxydes et de masse molaire de 600,88 g.mol⁻¹. Elle fait partie de la classe des xanthophylles. Ces derniers découlent de l'oxydation progressive des carotènes (molécules terpéniques pouvant être assimilées à la condensation de chaînes de 20 carbones).

La violaxanthine a un rôle protecteur chez les végétaux. Lors de fortes intensités lumineuses, elle est réduite (dé-époxydée) en zéaxanthine. L'excès d'énergie non utilisée par l'antenne collectrice est alors éliminé évitant la production de ROS toxiques pour la cellule. Sous une intensité lumineuse réduite, la zéaxanthine est de nouveau oxydée en violaxanthine (Ruiz, 2005).



Poids moléculaire =600,89 g.mol⁻¹
 Formule brute =C₄₀H₅₆O₄

Figure 77 : Formule chimique de la violaxanthine

3.2.2.4 CI_{50} en $mol.l^{-1}$ de la violaxanthine sur la lignée cellulaire MCF-7

La CI_{50} de la violaxanthine sur la lignée cellulaire MCF-7 est de $11,7 \pm 0,2 \mu g.ml^{-1}$; la pureté de la molécule purifiée est de 94,98% et sa masse molaire de $600,88 g.mol^{-1}$. La CI_{50} de la violaxanthine exprimée en molarité est $18,49 \pm 0,31 \mu M$. On parle d'activité antitumorale lorsque la CI_{50} d'un composé pur est inférieure ou égale à 5mM (Kornprobst, 2005).

Les résultats obtenus sont en accord avec l'étude menée par Cha *et al.* Ils ont montré qu'un extrait de *Chlorella ellipsoidea* avait une activité antiproliférative sur la lignée du cancer du colon HCT-116 ($CI_{50} = 40.31 \pm 4.43 \mu g.ml^{-1}$). Le caroténoïde majoritaire contenu dans l'extrait était la violaxanthine. Cependant leur étude ne permettait pas de définir que l'activité antiproliférative était portée par la violaxanthine contrairement aux résultats de notre étude.

A ce jour, il n'y a pas d'autres travaux consacrés à l'activité anticancéreuse de la violaxanthine.

3.2.2.5 Rendement d'extraction de la violaxanthine à partir de *Dunaliella tertiolecta*

La quantité de violaxanthine purifiée à partir de 1500mg de *D. tertiolecta* lyophilisée est de 0,910 mg. Selon les méthodes de purification utilisées, le rendement d'extraction est donc de 0,06 % (m : m). Les caroténoïdes représentent 0,1 à 0,2 % du poids sec des microalgues (Kadam & Prabhasankar, 2010). Le rendement d'extraction obtenu est donc satisfaisant, compte tenu des pertes dues à la purification.

La démarche bio-guidée a permis d'isoler la violaxanthine et de mettre en évidence son activité antiproliférative. Ce résultat montre que cette méthodologie est particulièrement adaptée pour mettre en évidence des molécules anticancéreuses issues de microalgues marines.

La seconde partie de l'étude est consacrée à l'évaluation du potentiel antiprolifératif, cytostatique, cytotoxique et pro-apoptotique de la violaxanthine issue de *D.tertiolecta*.

3.3 ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE, CYTOSTATIQUE ET APOPTOTIQUE DE LA VIOLAXANTHINE SUR LA LIGNEE MCF-7

3.3.1 Etude de l'activité antiproliférative

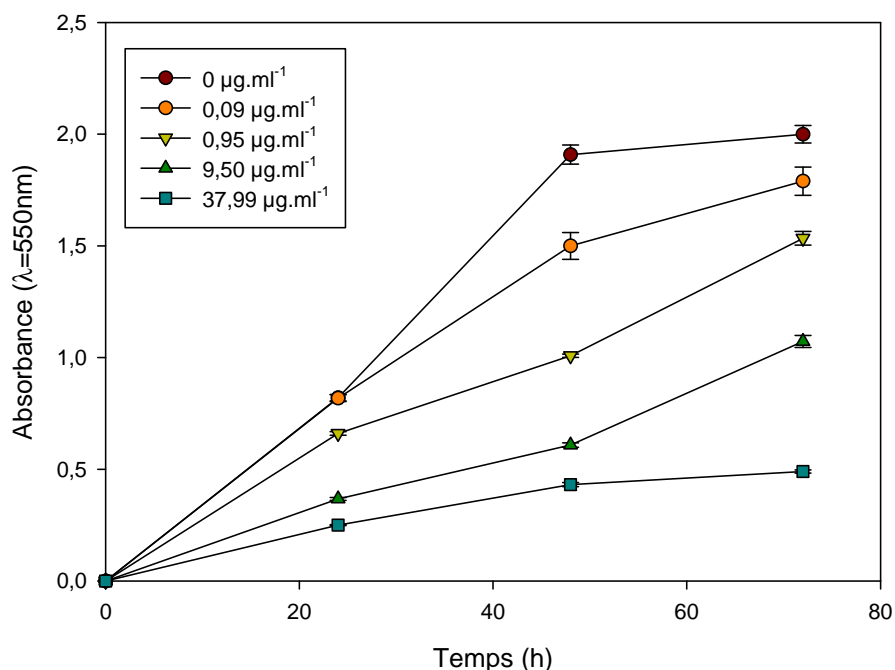


Figure 78 : Cinétiques de croissance continue sur cellules traitées par la sous-fraction F_{1.4} à différentes concentrations réalisées sur la lignée MCF-7

La figure 78 présente les cinétiques de croissance continues de la lignée MCF-7 en fonction de la concentration en violaxanthine en $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Ces résultats montrent une inhibition de la croissance cellulaire par rapport au témoin dès 24h de croissance pour une concentration de $0,95 \mu\text{g.ml}^{-1}$. A partir de 48h de croissance une inhibition de la croissance est mesurable pour une dose en violaxanthine de $0,09 \mu\text{g.ml}^{-1}$. L'effet antiprolifératif de la violaxanthine augmente en fonction de la concentration en violaxanthine.

Pour une concentration de $37,99 \mu\text{g.ml}^{-1}$, entre 48 et 72h, il n'y a pas de prolifération cellulaire. Ce résultat indique que la violaxanthine a un effet cytostatique à cette concentration.

Afin de compléter cette étude et de confirmer l'activité cytostatique de la violaxanthine, une étude en croissance discontinue est réalisée.

3.3.2 Etude de l'activité cytostatique de la violaxanthine

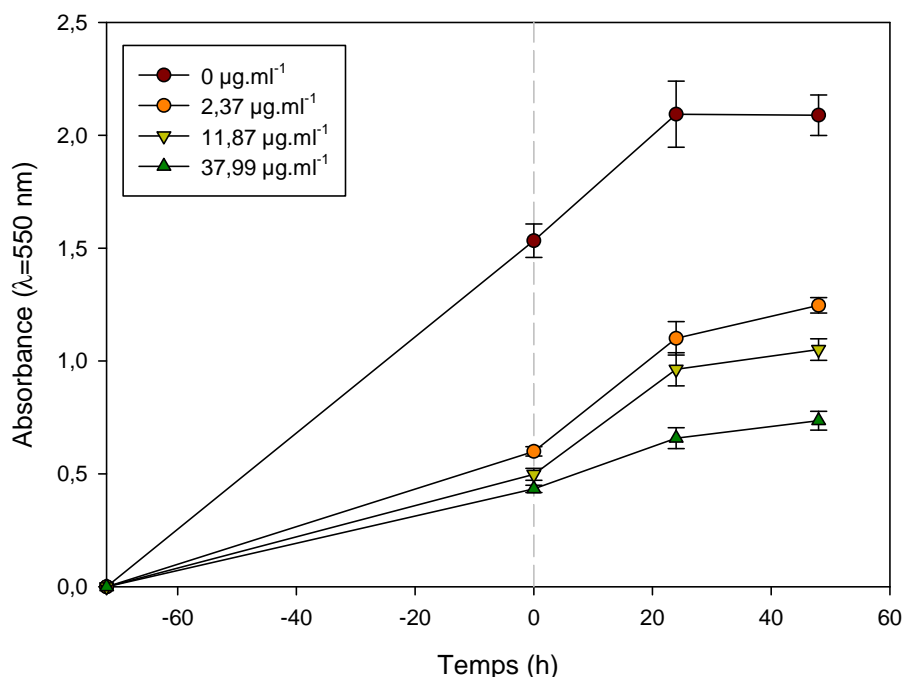


Figure 79 : Cinétiques de croissance discontinues sur cellules traitées par la Violaxanthine à différentes concentrations réalisées sur la lignée MCF-7

La figure 79 présente la cinétique de croissance discontinue de la lignée cellulaire MCF-7 en fonction de la concentration en violaxanthine en $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et pour des concentrations comprises entre 2,37 et 37,99 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Après 72h d'incubation, la croissance des cellules est inhibée pour toutes les concentrations de manière dose-dépendante.

Pour toutes les concentrations en violaxanthine testées, les cellules prolifèrent de nouveau lorsque le milieu de culture contenant la violaxanthine est remplacé par du milieu de culture neuf. Néanmoins, pour une concentration de 37,99 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, la reprise de la croissance est très lente, ce qui confirme l'effet cytostatique à partir de cette concentration.

La violaxanthine a un effet antiprolifératif et cytostatique. Cependant ce résultat montre que l'effet cytostatique est réversible, dans la mesure où en absence de violaxanthine les cellules prolifèrent de nouveau.

Afin de déterminer si la violaxanthine est cytotoxique, un test de viabilité cellulaire a été réalisé en présence de cette dernière.

3.3.3 Etude de l'activité cytotoxique de la violaxanthine

Tableau 18 : Mortalité des cellules de la lignée MCF-7 en fonction de la concentration en violaxanthine après 72h d'incubation

Concentration en violaxanthine $\mu\text{g.ml}^{-1}$	% de cellules mortes
0	4
7,60	33
37,99	44

Le tableau 18 présente la mortalité des cellules de la lignée MCF-7 en présence de la violaxanthine après 72h d'incubation. En absence de violaxanthine, la mortalité est de 4%, de 33% avec $7,60 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et de 44% avec $37,99 \mu\text{g.ml}^{-1}$. La violaxanthine est donc cytotoxique. Afin d'identifier le type de cytotoxicité induite par la violaxanthine, un marquage des Ps de la membrane plasmique et de l'ADN des cellules est réalisé. Ce marquage permettra de définir si la violaxanthine provoque la nécrose ou l'apoptose des cellules de la lignée MCF-7.

3.3.4 Etude de l'activité apoptotique de la Violaxanthine

3.3.4.1 Marquage à l'Annexine-V des phosphatidylsérines de la membrane plasmique

La figure 80 correspond aux observations réalisées en microscopie à fluorescence des cellules de lignée MCF-7 marquées par le marqueur d'ADN BOBO-1 (vert) et par l'Annexine-V-Alexa 568 (rouge) après 48h d'incubation en présence de la violaxanthine, à une concentration de $0 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (témoin) (figure 63A et A') et de $7,60 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (figure 63 B et B'). Les cellules colorées uniquement en vert correspondent aux cellules mortes qui lors du marquage ont perdu totalement leur intégrité membranaire. Les cellules colorées en rouge et marquées d'une flèche rouge sont les cellules entrées en apoptose. Les cellules rouges et vertes sont les cellules nécrotiques, elles sont indiquées par une flèche brune. En absence de violaxanthine, la proportion de cellules apoptotiques parmi les cellules mortes est comprise entre 0 et 6%. En présence de $7,60 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de violaxanthine, la proportion de cellules apoptotiques est comprise entre 5 et 23% et la proportion de cellules nécrotiques est comprise entre 5 et 15%. Ces résultats indiquent que la violaxanthine est cytotoxique pour une concentration de $7,60 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et présente une activité pro-nécrotique et pro-apoptotique sur les cellules MCF-7.

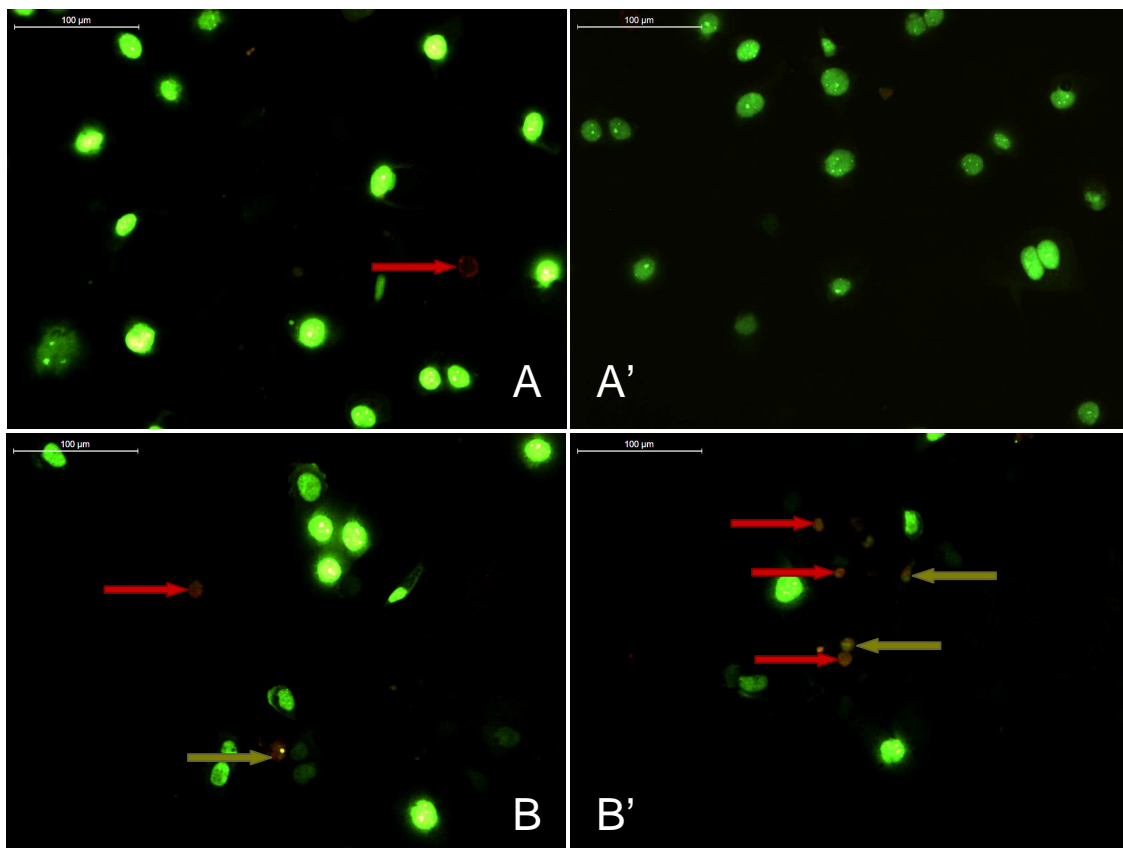


Figure 80 : Observation microscopique en fluorescence ($\times 200$) de cellules de lignée MCF-7 marquées par le marqueur d'ADN BOBO-1 (vert) et par l'Annexine-V-Alexa 568 (rouge) après 48h d'incubation en présence de $0 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (A et A') et de $8 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (B et B') de violaxanthine. Les flèches rouges indiquent les cellules entrées en apoptose, les flèches brunes indiquent les cellules entrées en nécrose

La marque définitive de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN génomique résultant de l'activation par les caspases d'une endonucléase Ca^{2+} et Mg^{2+} -dépendante. Elle fragmente l'ADN entre les unités nucléosomales ce qui génère des fragments d'ADN d'une taille caractéristique de 180 pb. Ces fragments d'ADN peuvent être révélés à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose.

Cette expérimentation est actuellement en cours de réalisation.

3.3.5 Discussion concernant l'activité antiproliférative et cytotoxique de la violaxanthine

3.3.5.1 Les caroténoïdes : molécules anticancéreuses

Une consommation importante de fruits et légumes riches en caroténoïdes est associée à une baisse de l'incidence des cancers (Cui *et al.*, 2007). Si les caroténoïdes ne sont pas utilisés comme agents thérapeutiques, leur rôle dans la prévention des cancers est largement documenté. La figure 81 représente la structure chimique du β,β -carotène, de la lutéine, de la zéaxanthine, du lycopène, de l'astaxanthine et de la canthaxanthine.

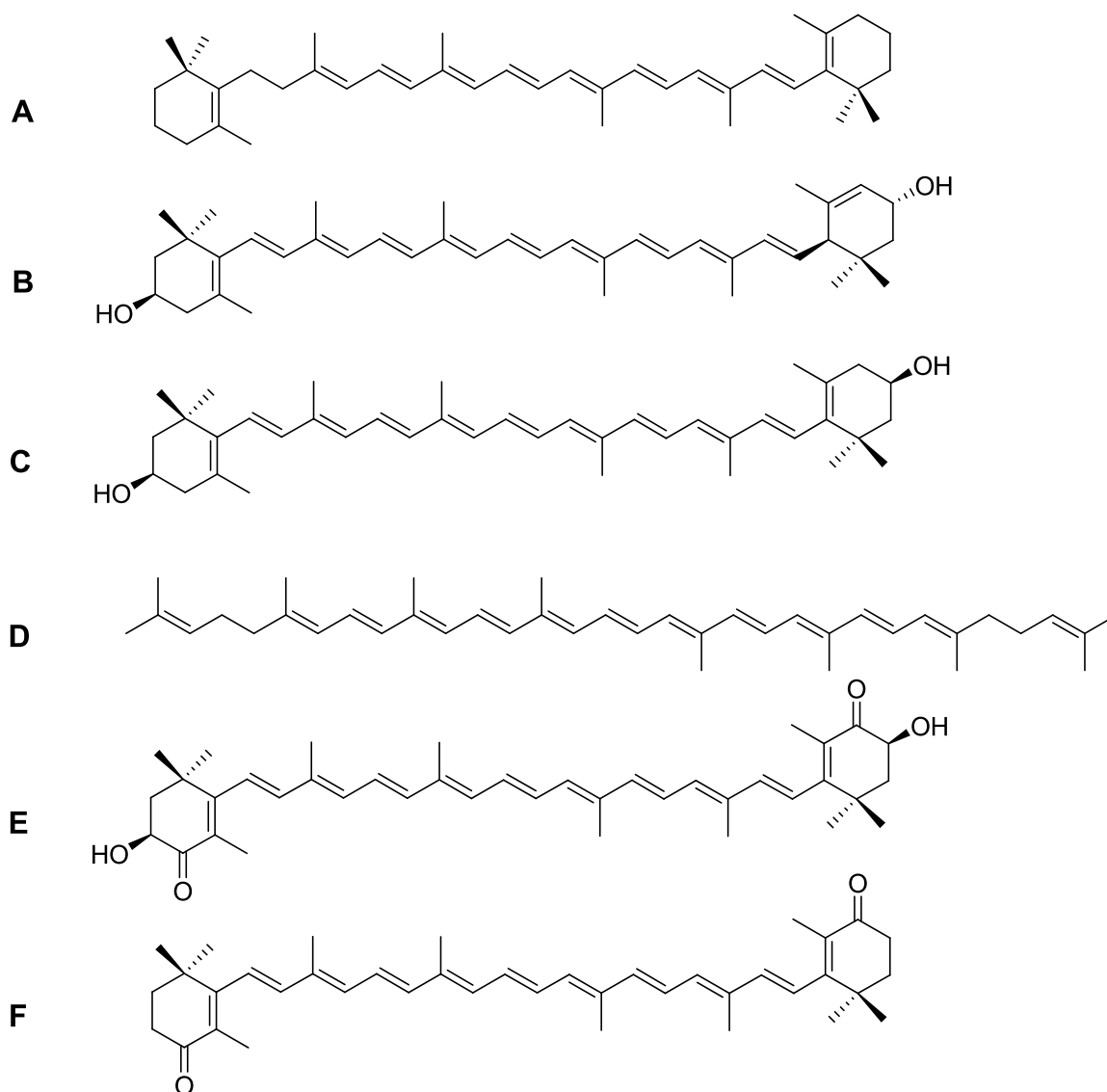


Figure 81 : Structure chimique de différents caroténoïdes : β,β -carotène (A), lutéine (B), zéaxanthine (C), lycopène (D), astaxanthine (E), canthaxanthine (F)

Le β,β -carotène, β,α -carotène, la lutéine, la zéaxanthine, le lycopène, la β -cryptoxanthine, l'astaxanthine (Nishino *et al.*, 2009; Nishino *et al.*, 2000) sont des molécules qui préviennent la formation des cancers *via* l'alimentation. Le β,β -carotène (Cui *et al.*, 2007), le lycopène, la néoxanthine, la lutéine, la cantaxanthine, (Kotake-Nara *et al.*, 2005), et la fucoxanthine ont montré une activité antiproliférative et apoptotique sur différentes lignées cellulaires cancéreuses.

La fucoxanthine est le caroténoïde qui a été le plus étudié pour son activité antiproliférative. Elle montre des activités antiprolifératives sur:

- La lignée de cancer hépatique HepG2 (Das *et al.*, 2008)

Elle montre une activité antiproliférative et apoptotique sur :

- les lignées cancéreuses du poumon A549 et NSCLC-6 (Moreau *et al.*, 2006b),
- la lignée de cancer de la prostate PC-3 (Kotake-Nara *et al.*, 2005),
- des cancers hépatiques (Das *et al.*, 2008),
- la lignée de cancer du colon Caco-2 (Hosokawa *et al.*, 2004),
- la lignée de cancer du colon WiDr (Das *et al.*, 2005),
- la lignée HL-60 (leucémie) (Hosokawa *et al.*, 1999; Nakazawa *et al.*, 2009).

La fucoxanthine est d'autant plus intéressante pour les traitements anticancéreux qu'elle ne présente pas de toxicité chez les souris (Beppu *et al.*, 2009). De plus, le fucoxanthinol issu d'une ascidie, est également retrouvé dans le corps après ingestion de fucoxanthine (Beppu *et al.*, 2009) présente une activité antiproliférative et apoptotique sur des lignées de cancer du sein, du colon et sur des leucémies (Mayer & Gustafson, 2006).

La néoxanthine a également montré une activité antiproliférative et apoptotique sur la lignée PC-3 de cancer de la prostate (Kotake-Nara *et al.*, 2005).

Ces deux caroténoïdes sont 5,6-monoépoxydés et possèdent une liaison de type allénique (Cf. figure 82). (Cha *et al.*, 2008; Kotake-Nara *et al.*, 2005). Cette caractéristique structurale est suspectée d'être à l'origine de leur activité (Cf. figure 59) (Nakazawa *et al.*, 2009).

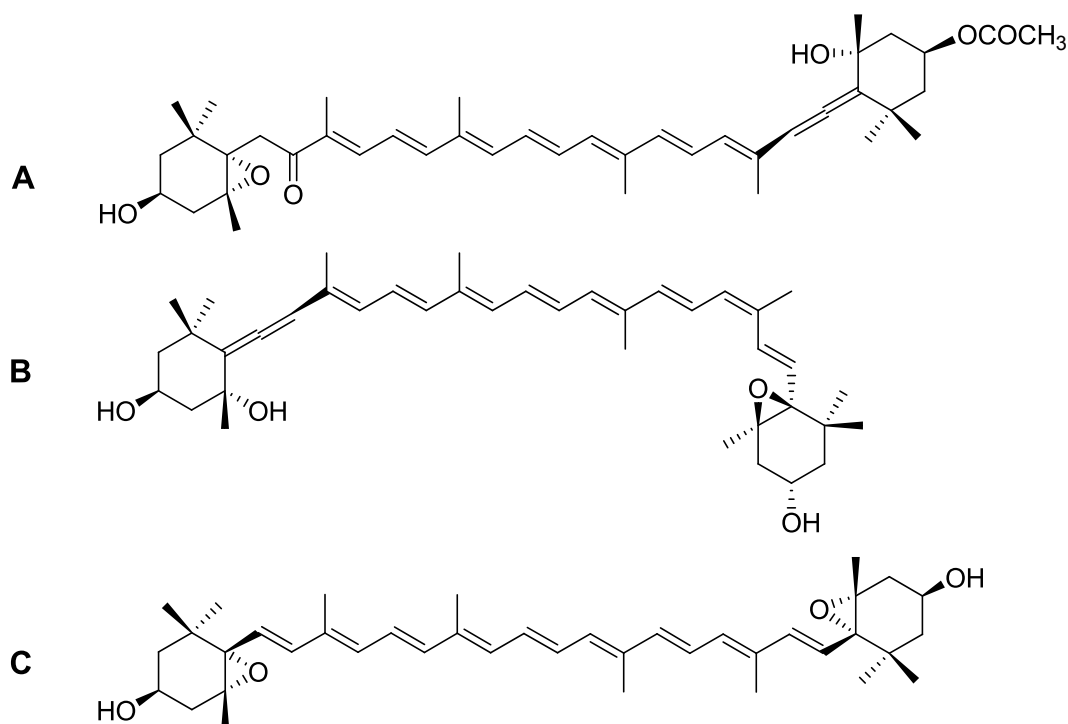


Figure 82 : Structure chimique de la fucoxanthine (A), de la néoxanthine (B) et de la violaxanthine (C)

Nakazawa *et al* (2009) se sont intéressés à l'effet antiprolifératif de plusieurs isomères de la fucoxanthine sur différentes lignées de cellules cancéreuses (Leucémie : HL60 ; colon : Caco-2 ; prostate : PC-3, LNCap), afin d'en évaluer l'effet antiprolifératif et apoptotique. Cette étude montre que les isomères 13'-cis sont les plus actifs sur les lignées HL60 et Caco-2. Il faut préciser que ce sont les isomères trans qui sont principalement extraits des algues brunes. Cette étude met en évidence l'importance de la stéréochimie dans l'action des caroténoïdes sur les cellules cancéreuses.

La violaxanthine est doublement époxydée (Cf. figure 82), mais ne possède pas de liaison de type allénique. La présence des fonctions époxydes pourrait expliquer l'activité de la violaxanthine sur la lignée cellulaire MCF-7.

L'ensemble de ces études montre que les caroténoïdes, et en particulier les caroténoïdes époxydés, sont des molécules d'intérêt dans les traitements du cancer. Différentes études ont été consacrées à l'action de ces molécules sur différentes lignées cellulaires cancéreuses et à l'identification de leurs cibles moléculaires.

3.3.5.2 Les cibles moléculaires des caroténoïdes

Les cibles moléculaires de la fucoxanthine

La fucoxanthine induit l'apoptose sur les cellules humaines du cancer de la prostate PC3 (Kotake-Nara *et al.*, 2005), les cellules de cancer du colon Caco-2 (Hosokawa *et al.*, 2004) et sur la lignée HL-60 (Nakazawa *et al.*, 2009), en diminuant l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Il a également été démontré que la fucoxanthine inhibe la prolifération des cellules de cancer hépatique HepG2, d'adénocarcinome WiDr et de cancer de la prostate (DUI45), en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁.

Pour les cellules HepG2, cet effet antiprolifératif est couplé à une baisse du niveau d'expression des cyclines D ce qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire (Das *et al.*, 2008).

Chez les cellules d'adénocarcinome WiDr, l'effet antiprolifératif se traduit par une augmentation du niveau d'expression de P21^{WAF1/CIP1} inhibitrice de CdK (Das *et al.*, 2005).

Enfin, sur les cellules du cancer de la prostate (DUI45), il a été mis en évidence que la fucoxanthine provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G₁ *via* l'inhibition de l'expression du gène p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Satomi & Nishino, 2009).

Par ailleurs, il a été montré que des hauts niveaux cellulaires de ROS déclenchaient l'apoptose et la nécrose (Kotamraju *et al.*, 2004) et que des molécules anticancéreuses induisaient l'apoptose *via* cette voie. A partir de ces travaux, Kim *et al* (2010) se sont intéressés à l'impact de la fucoxanthine sur l'induction de l'apoptose *via* une augmentation du niveau des ROS intracellulaires. Pour la lignée HL-60 (leucémie), ils ont montré que la fucoxanthine induisait une augmentation du niveau de ROS intracellulaires. Cette augmentation conduit à l'activation de l'apoptose par diminution du niveau d'expression de Bcl-x_L entraînant l'activation des caspases -3 et -7. Le mécanisme d'action sur les cellules HL-60 proposé par Kim *et al* est présenté sur la figure 83.

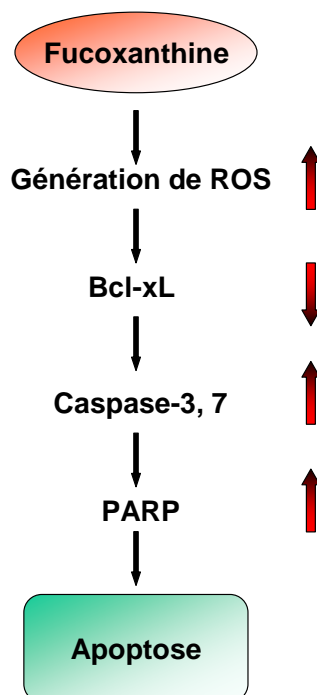


Figure 83 : Mécanisme d'action proposé par Kim *et al.*, pour l'induction de l'apoptose par la fucoxanthine sur la lignée HL-60. La flèche pointée vers le bas correspond à une diminution du niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L. Les flèches pointées vers le haut correspondent à une augmentation du niveau intracellulaire de ROS ou à l'augmentation du niveau d'expression des protéines concernées (Kim *et al.*, 2010)

Les cibles moléculaires du β,β -carotène

De fortes concentrations de β,β -carotène montrent des activités apoptotiques associées à la génération de ROS des cellules d'adénocarcinome du colon WiDr et la lignée HL-60 (leucémie). Sur les cellules WiDr de cancer du colon, le β,β -carotène augmente le niveau intracellulaire de ROS, qui inhibe les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Palozza *et al.*, 2001).

Cui *et al* se sont intéressés au potentiel apoptotique du β,β -carotène sur les cellules de cancer du sein MCF-7. Ils ont étudié l'effet du β,β -carotène sur le niveau de ROS intracellulaire et sur le niveau d'expression de la protéine PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) impliquée dans le développement et la différenciation des cellules. PPAR- γ est exprimé dans de nombreux cancers, il est suspecté de jouer un rôle important dans la carcinogénèse.

Au terme de cette étude, ils ont montré que le β,β -carotène induit l'apoptose chez les cellules MCF-7. Ce phénomène est couplé à une augmentation du niveau de ROS intracellulaire. Le β,β -carotène induit une augmentation du niveau d'expression de la protéine PPAR- γ . Cette étude a également montré que le β,β -carotène provoquait une augmentation du niveau d'expression de la protéine P21^{WAF1/CIP1}, conduisant au blocage du cycle cellulaire en G₁. Dans cette étude, il est suggéré que l'augmentation du niveau d'expression du récepteur PPAR- γ est à l'origine de l'augmentation du taux d'expression de protéine P21^{WAF1/CIP1}.

Les cibles moléculaires de la néoxanthine

Kotaké-nara *et al* (2005) ont montré que la Néoxanthine déclenchait l'apoptose *via* une diminution du niveau d'expression de Bcl-2 et un clivage de la pro-caspase-3, chez les cellules PC-3 de cancer de la prostate.

Les cibles moléculaires suspectées de la violaxanthine

Les travaux cités précédemment montrent que les caroténoïdes ont une action sur les protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques. De nombreuses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont modulées par la fucoxanthine.

Le niveau de ROS intracellulaire semble être un indicateur important. Dans l'étude de Kim *et al*, il a été montré que là où la fucoxanthine ne montrait pas de potentiel antiprolifératif, le niveau de ROS n'était pas augmenté. L'augmentation du niveau de ROS intracellulaire couplé au phénomène d'apoptose a également été souligné sur la lignée cellulaire MCF-7 en présence de β,β -carotène (Cui *et al.*, 2007).

Une étude sur les cibles moléculaires de la violaxanthine devra donc s'intéresser en priorité à ces différentes pistes.

4 POURSUITE DE L'ETUDE ET PERSPECTIVES

4.1 EXTRAIT AQUEUX DE *POLYPODOCHRYSIS TEISSIERI*

L'extrait aqueux de *Polypodochrysis teissieri* présente une CI_{50} de $19,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sur la lignée MCF-7. Cette CI_{50} est la plus faible mesurée pour un extrait brut dans cette étude. La démarche bioguidée adoptée précédemment doit l'être également sur cet extrait.

4.2 ACTIVITES ET CIBLES DE LA VIOLAXANTHINE

La violaxanthine a montré une activité antiproliférative sur la lignée de cancer du sein MCF-7. L'étude des cibles moléculaires de la violaxanthine sur la lignée cellulaire MCF-7 est donc une des premières pistes de travail. Il est également important d'évaluer l'activité de cette molécule sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses.

4.3 ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE DES AUTRES CAROTENOÏDES

De nombreuses études sont consacrées à la fucoxanthine et à son implication dans les mécanismes d'induction de l'apoptose chez les cellules cancéreuses. Quelques études sont consacrées aux autres caroténoïdes. Un aspect important serait donc d'étudier le potentiel antiprolifératif et apoptotique d'autres caroténoïdes sur différentes lignées cellulaires cancéreuses.

Par exemple, la diadinoxanthine (mono-époxyde) impliquée dans le cycle des xanthophylles chez certains hétérokontes, est une molécule qui pourrait se révéler intéressante. La structure de la diadinoxanthine est présentée sur la figure 84.

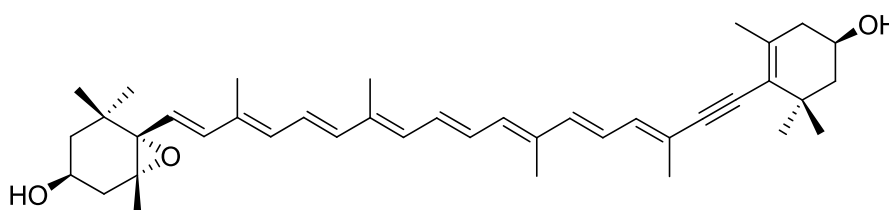


Figure 84 : Structure chimique de la diadinoxanthine

5 CONCLUSION

Le travail mené sur l'extraction, la purification et la caractérisation de molécules antiprolifératives à partir de microalgues marines a permis de mettre en évidence que :

- Parmi douze extraits provenant de quatre espèces de microalgues marines, deux présentent des activités intéressantes sur lignées cellulaires cancéreuses. L'un des deux extraits a fait l'objet d'une recherche bioguidée du principe actif. Ces bons résultats montrent la potentialité des microalgues marines pour la mise en évidence de nouvelles molécules anticancéreuses.
- La violaxanthine a été isolée et identifiée. Sur la lignée de cancer du sein MCF-7, sa CI_{50} est de $11,7 \pm 0,2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($18,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$). Elle possède une activité antiproliférative.
- La violaxanthine montre une activité cytotatique réversible sur la lignée MCF-7 à partir $74 \mu\text{M}$ ($38 \mu\text{g.ml}^{-1}$)
- La violaxanthine est cytotoxique pour les cellules cancéreuses de la lignée MCF-7.
- La violaxanthine induit l'apoptose et la nécrose sur la lignée MCF-7
- Les méthodes d'extraction de molécules organiques sont efficaces et le rendement d'extraction obtenu après purification de la violaxanthine est de 0,06%. Compte tenu de la teneur en caroténoïdes chez les microalgues marines, ce rendement est satisfaisant.
- La CLHP est une technique valable pour analyser le profil de composition moléculaire des extraits et purifier des molécules d'intérêt. Un protocole global d'extraction et d'analyse des molécules extraites a été développé et validé.
- Ce travail a mené à la rédaction d'un article qui sera prochainement soumis et intitulé : « Bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts: Isolation and identification of violaxanthin as a potent antiproliferative and apoptosis inducer on human breast cancer cell lines »

CHAPITRE 3

DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES CONCERNANT L'EXTRACTION, L'ANALYSE ET LA PURIFICATION DES PIGMENTS ISSUS DE MICROALGUES MARINES

SECTION 1 : CONTEXTE ET DEMARCHE

Dans le chapitre 2, nous avons vu que la violaxanthine présente une activité antiproliférative et un potentiel pro-apoptotique sur la lignée de cancer du sein MCF-7.

De nombreuses autres études ont montré le potentiel antiprolifératif et pro-apoptotique de la fucoxanthine, de la néoxanthine, et du β,β -carotène sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, ainsi que les propriétés antioxydantes des caroténoïdes.

Les pigments et en particulier les caroténoïdes sont des molécules à fort potentiel pour le secteur de la santé.

Les microalgues marines possèdent des pigments caroténoïdes qui ne sont pas retrouvés chez les végétaux terrestres. Par exemple, la diatoxanthine et la diadinoxanthine impliquées dans le cycle des xanthophylles chez certains ochrophytes ne sont pas présentes chez les plantes supérieures.

La plupart des pigments caroténoïdes issus des microalgues marines sont disponibles commercialement. Cependant, ils sont vendus sous forme liquide et à de faibles concentrations. Par exemple, la violaxanthine commerciale utilisée dans le chapitre 2 est en solution dans 2,5 ml d'éthanol absolu pour une concentration de 1,010 mg.l⁻¹. Ce format est difficilement compatible avec la réalisation d'études biologiques sur lignées cellulaires cancéreuses.

L'amélioration des rendements d'extraction et de purification des pigments issus de microalgues marines constitue un point important pour l'étude des différents pigments caroténoïdes à activité anticancéreuse.

Ce chapitre présente une partie des travaux qui ont permis le développement des méthodes d'extraction, d'analyse et de purification des pigments utilisées dans le chapitre 2. Il se divise en deux grands axes qui sont :

- Les développements des méthodes d'analyse et de purification des pigments de microalgues par CLHP.
- L'étude de différents procédés d'extraction de pigments de microalgues marines.

Pour ces deux axes, certaines des conditions expérimentales sont communes :

- les espèces de microalgues utilisées,
- les conditions de culture des microalgues marines,
- les solvants d'extraction utilisés.

Ces aspects seront traités dans cette section du chapitre 3. Le développement des méthodes d'analyse et de purification des pigments microalgaux sera abordé dans la section 2. Enfin, l'étude consacrée aux différents procédés d'extraction de pigments de microalgues marines sera développée dans la section 3.

1 SELECTION DES MICROALGUES MARINES

Les microalgues sélectionnées doivent permettre :

- le développement de la méthode d'analyse de pigments,
- le développement des méthodes d'extraction de pigments.

Les microalgues possèdent souvent une structure périphérique qui peut être située sur ou sous la membrane plasmique, ou les deux. Ces structures varient selon les groupes de microalgues marines (de Reviers, 2002). Par exemple, la paroi des cyanobactéries est constituée de peptidoglycane contenant des lipoprotéines. Les glaucophytes sont nues ou pourvues d'une couche externe cellulosique ou non. Les algues rouges ont une paroi composée d'une partie rigide constituée de cellulose, mannanes ou xylanes et d'une partie mucilagineuse formée le plus souvent de galactanes. Chez les algues vertes, la cellulose est le polymère le plus fréquemment retrouvé. Les euglénophycées sont pourvues d'une paroi caractéristique appelée cuticule, constituée de protéines fibrillaires soutenues par des microtubules et situées sous la membrane plasmique. Les Prymnesiophyceae sont le plus souvent couvertes d'une ou plusieurs épaisseurs d'écailles organiques constituées de deux couches de microfibrilles. Les diatomées sont pourvues d'une structure périphérique siliceuse bivalve appelée frustule. A la périphérie de la cellule des dinophytes se situe une couche superficielle de vésicules polygonales aplaties qui contiennent souvent des plaques cellulosiques qui constituent « l'armure » (de Reviers, 2002).

Les deux modèles sélectionnés doivent présenter des structures péri-cellulaires de nature différentes et doivent être représentatifs de leur embranchement, classe ou famille.

L'objectif du développement de la méthode d'analyse est de permettre la quantification des différents pigments de manière efficace et rapide. Les deux modèles d'étude sélectionnés, doivent présenter une composition pigmentaire représentative de l'ensemble de ces différentes familles de pigments. Ils doivent néanmoins présenter des profils pigmentaires différents. Par ailleurs, les modèles sélectionnés doivent être cultivables en photobioréacteur.

Cylindrotheca closterium et *Dunaliella tertiolecta* ont été choisies comme modèle sur la base de ces différents critères.

Cylindrotheca closterium appartient à la classe des Bacillariophyceae (diatomée) (lignée brune), qui est la classe la plus représentée, la plus abondante et la mieux connue parmi le phytoplancton (Jeffrey *et al.*, 1997). Les diatomées sont caractérisées par la présence d'une frustule, constituée de silice entourant la cellule. La frustule est composée d'un manteau organique externe et d'une paroi interne complexe formée de silice hydratée et polymérisée.

Les cellules de *Cylindrotheca closterium* sont isolées. La partie centrale est fusiforme ou cylindrique. Les deux extrémités sont minces, rostrées, et parfois arrondies. D'un bout à l'autre de ses extrémités, la cellule mesure de 40 à 90 μm (Abramson *et al.*, 2009). Une observation microscopique de *C. closterium* est présentée sur la figure 41. Les pigments majoritairement retrouvés sont la fucoxanthine et la chlorophylle *a*.



Figure 85 : Observation microscopique de *Cylindrotheca closterium*¹

Dunaliella tertiolecta appartient à la classe des Chlorophyceae (lignée verte). Les espèces appartenant au genre *Dunaliella* présentent une petite cellule (<20 μm) dépourvue de frustule, couverte de cellulose, de xylanes, de mannanes et/ou de glycoprotéines, avec deux flagelles de taille identique insérés à l'apex de la cellule. La chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* et le β,β -carotène sont les principaux pigments (Jeffrey *et al.*, 1997).

¹ photographie de *Cylindrotheca closterium* : www.dnr.state.md.us

2 CONDITIONS DE CULTURE DES MICROALGUES MARINES

Les conditions de culture des différentes microalgues utilisées dans l'étude sont présentées dans le tableau 19. La culture des microalgues est réalisée à l'IFREMER de Nantes, au laboratoire PBA.

La matrice utilisée pour les deux espèces est l'eau de mer, filtrée sur 0,2µm puis stérilisée. Elles sont cultivées dans du milieu de Conway (Walne 1970). *D. tertiolecta* est cultivée dans un volume de 10 L à 20°C sous une irradiation lumineuse de 180 µmol.m⁻².s⁻¹, en mode batch, et sans régulation de pH. *C. closterium* est cultivée dans un volume de 2,2 L à 21°C, sous une irradiation lumineuse de 120 µmol.m⁻².s⁻¹ à pH 7,6. Pour les deux cultures, il n'y a pas de photopériode. Après culture, les microalgues sont récupérées. Le milieu de culture est éliminé par centrifugation douce. Pour *D. tertiolecta* la centrifugation est réalisée à 4000g, pendant 20 minutes à 10°C et pour *C. closterium*, la centrifugation est réalisée à 3500g pendant 15 minutes à 4°C. Les microalgues sont ensuite congelées à -20°C et envoyées au laboratoire LIENSs de l'Université de La Rochelle.

Tableau 19 : Conditions de culture de *Cylindrotheca closterium*

Espèce	<i>Cylindrotheca closterium</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>
Souche	AC170 (Algo-banque, France)	CCMP 364
Axénie de la souche	Non	
Type de culture	Batch	
Volume de culture	2,2 l	10 l
Matrice	Eau de mer (salinité 35.1) stérilisée sur 0.2µm puis autoclavée	
Milieu	milieu de Conway (Walne 1970)	
Photopériode	aucune (lumière continue)	
Irradiance	120 µmol.m ⁻² .s ⁻¹	180 µmol.m ⁻² .s ⁻¹
Température	21°C	20°C
Régulation pH	7,6	Non
Méthode de concentration	centrifugation (3500g, 15 mn, 4°C)	centrifugation (4000g, 20 mn, 10°C)

A leur réception, les microalgues sont lyophilisées à une température de -55°C et à une pression inférieure à 1 hPa. Le lyophilisateur utilisé est équipé d'un condenseur HetoLyoPro 3000 et d'un piège à glace Heto Cooling Trap (Therma Electron Corporation, France).

3 SELECTION DU SOLVANT D'EXTRACTION

Pour le développement des méthodes d'analyse ainsi que pour l'étude des différents procédés d'extraction, l'acétone pure a été choisie car:

- La plupart des pigments photosynthétiques sont solubles dans ce solvant ; des plus apolaires (carotènes) au plus polaires (phéopigments et xanthophylles). Un mélange acétone/eau (90/10) est recommandé pour l'analyse des pigments issus de microalgues marines (Jeffrey *et al.*, 1997; Parsons *et al.*, 1984; Strickland & Parsons, 1972).
- L'acétone limite l'activité des chlorophyllases qui sont des enzymes liées aux thylacoïdes et qui sont responsables de la dégradation des chlorophylles. L'activité des chlorophyllases augmente avec la présence d'eau (Jeffrey *et al.*, 1997). Il est conseillé d'utiliser de l'acétone pure pour limiter leur activité. Cette enzyme est connue pour être présente chez les diatomées et chez les microalgues marines appartenant à la classe des Chlorophyceae (Jeffrey & Hallegraeff, 1987).

SECTION 2 : DEVELOPPEMENT DES METHODES D'ANALYSE ET DE PURIFICATION DES PIGMENTS DE MICROALGUES MARINES

1 LES METHODES D'ANALYSE DE PIGMENTS DE MICROALGUES MARINES

Des méthodes pour l'analyse des pigments de microalgues marines ont déjà été développées pour l'écologie marine. Par exemple, le dosage de la chlorophylle *a*, dans un échantillon d'eau de mer permet d'estimer la concentration en phytoplancton (Aminot & Kérouel, 2004).

Le dosage des pigments phytoplanctoniques repose sur leurs caractéristiques spectroscopiques : absorption de lumière (spectrophotométrie) ou fluorescence. La mesure spectroscopique sur l'extrait peut être réalisée soit par des méthodes traditionnelles, c'est-à-dire non séparatives (dosages spectrophotométriques) ou bien en utilisant des méthodes séparatives comme la chromatographie et notamment la CLHP (Aminot & Kérouel, 2004; Jeffrey, 1981; Jeffrey *et al.*, 1997).

La monographie de Jeffrey *et al* (1997) constitue l'ouvrage de référence pour l'analyse des pigments de microalgues marines par CLHP et cette technique présente l'avantage d'être facilement adaptable pour la purification de molécules d'intérêt.

En CLHP, la séparation des différentes molécules d'un mélange est basée sur la polarité propre de chaque molécule. Les pigments présentent des polarités différentes selon leur nature. Les chlorophylles possèdent une chaîne phytyle pour leur fixation à la membrane thylacoïdale. Cette caractéristique leur confère un caractère hydrophobe. Les carotènes, molécules terpéniques pouvant être assimilées à la condensation de chaînes de 20 carbones, sont également hydrophobes. Les xanthophylles qui découlent de l'oxydation progressive des carotènes sont des molécules qui présentent un caractère amphiphile. Cette caractéristique est également retrouvée chez les pigments de type phéophorbide qui sont des chlorophylles dépourvues de chaîne phytyle et d'atome de magnésium.

Le but de la standardisation de la méthode d'analyse des pigments est de pouvoir séparer sur un même chromatogramme la plupart des pigments issus de microalgues marines pour :

- permettre un dosage des pigments pour toutes les espèces de microalgues
- permettre de purifier les pigments de microalgues, en utilisant la CLHP en mode préparatif.

Par conséquent, une partie du travail présenté dans ce chapitre décrit le développement d'une méthode d'analyse et de purification efficace des pigments extraits de microalgues par CLHP.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 EXTRACTION DES PIGMENTS DE MICROALGUES MARINES

Les molécules présentes dans les microalgues sont extraites par macération directement dans le solvant. Les microalgues marines sont mises en contact avec le solvant selon le ratio 50 mg de biomasse lyophilisée pour 30 ml d'acétone. L'extraction est réalisée à 20°C, pendant 30 min, sous agitation magnétique, à l'obscurité et sous atmosphère inerte d'argon, afin de préserver les pigments photosynthétiques de la photo-oxydation. Après extraction, l'extrait obtenu est séparé des microalgues par filtration sur une membrane PVDF, 0,22 µm. Le filtrat obtenu est ensuite analysé par CLHP.

2.2 METHODE D'ANALYSE

2.2.1 Matériels

Les extraits sont analysés par CLHP équipée d'une pompe (Waters, W600), d'un injecteur (Waters, W717) et d'un détecteur PDA (Waters, W486). La CLHP est utilisée en phase inverse, avec une colonne analytique Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm x 4,6mm, 10 µm). Le PDA permet de détecter les molécules absorbant pour des longueurs d'onde comprises entre 190 et 600 nm. La longueur d'onde choisie pour l'ensemble des analyses est 435 nm. Elle permet de détecter l'ensemble des pigments solubles dans les solvants organiques: chlorophylles, carotènes et phéopigments (Jeffrey *et al.*, 1997). Le volume d'injection est de 50µl.

2.2.2 Gradient HPLC

Les tableaux 20 et 21 présentent les deux gradients utilisés dans l'étude pour la standardisation des méthodes d'analyse. Pour ces deux gradients, la phase mobile a un débit de 1ml.min⁻¹. Les différents solvants d'élution sont le méthanol/eau (80/20) (a), l'acétonitrile/eau (90/10) (b) et l'acétate d'éthyle (c). Le tableau 20 représente le premier gradient utilisé dérivé de la méthode préconisée par Jeffrey *et al.*

Le gradient A a fait l'objet d'une optimisation afin d'améliorer la séparation des différents pigments présents dans les extraits. Le gradient B résulte de ce travail (Cf. tableau 21). Il s'agit du gradient utilisé dans le chapitre 2 pour l'analyse des différents extraits de microalgues.

Tableau 20 : Gradient et solvant utilisés en CLHP analytique = Gradient A

Temps (min)	Débit (ml/min)	%a	%b	%c
0	1	100	0	0
4	1	0	100	0
18	1	0	20	80
21	1	0	100	0
24	1	100	0	0
29	1	100	0	0

Avec a : méthanol/eau (80/20)

Avec b : acétonitrile/eau (90/10)

Avec c : acétate d'éthyle

Colonne mode analytique : Phenomenex Luna C₁₈(2) (250 mm x 4,6 mm, 10 µm)

Tableau 21 : Gradient et solvant utilisés en CLHP analytique = Gradient B

Temps (min)	Débit (ml/min)	%a	%b	%c
0	1	100	0	0
3	1	0	100	0
35	1	0	30	70
38	1	0	0	100
41	1	0	0	100
43	1	0	100	0
45	1	100	0	0
47	1	100	0	0

Avec a : méthanol/eau (80/20)

Avec b : acétonitrile/eau (90/10)

Avec c : acétate d'éthyle

Colonne mode analytique : Phenomenex Luna C₁₈(2) (250 mm x 4,6 mm, 10 µm)

2.3 EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA METHODE D'ANALYSE

L'efficacité de la méthode est déterminée par le calcul de la résolution entre les différents pics du chromatogramme. Plus la résolution (R_S) est grande, meilleure est la séparation entre deux pics. Ainsi pour deux composés conduisant à des pics de temps de rétention voisin, la séparation est pratiquement complète quand R_S est égale à 1. Pour des valeurs de R_S inférieures à 1, les pics se chevauchent et pour R_S inférieur à 0,8 la séparation est généralement insuffisante (Rosset *et al.*, 1991). L'équation 2 permet de calculer la résolution des pics du chromatogramme.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} \quad N = 16 \times \left(\frac{t_r}{\omega_{\tan}} \right)^2 \quad R_S = \frac{1}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \times (N_2)^{1/2}$$

avec :

- k , facteur de rétention,
- α , facteur de séparation,
- N , nombre de plateaux théoriques,
- R_S , résolution,
- t_0 , front du solvant en minute,
- t_r , temps de rétention du composé en minute.

NB : l'indice 2 correspond à l'espèce la plus retenue.

Équation 2 : Calcul de la résolution entre les différents pics d'un chromatogramme

2.4 PASSAGE DE LA METHODE D'ANALYSE A LA METHODE DE PURIFICATION

La méthode de purification des pigments dérive de la méthode d'analyse. La purification des pigments est réalisée par CLHP en mode semi-préparatif ou en mode préparatif. Les colonnes utilisées sont pour :

- le mode semi-préparatif : Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm x 10,00 mm, 10 µm)
- le mode préparatif : Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm x 21,20 mm, 10 µm)

Tableau 22 : Colonnes et Gradients de solvants sélectionnés en CLHP semi-préparative et préparative

Temps (min)	Débit (ml.min ⁻¹)		Solvants		
	<i>Semi-préparatif</i>	<i>Préparatif</i>	%a	%b	%c
0	5	10	100	0	0
3	5	10	0	100	0
35	5	10	0	30	70
38	5	10	0	0	100
41	5	10	0	0	100
43	5	10	0	100	0
45	5	10	100	0	0
47	5	10	100	0	0

a : méthanol/eau (80/20)

b : acétonitrile/eau (90/10)

c : acétate d'éthyle

Colonne mode semi-préparatif : Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm x 10,0 mm, 10 µm)

Colonne mode préparatif : Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm x 21,2 mm, 10 µm)

Le tableau 22 présente les débits et colonnes utilisés en fonction du mode de purification utilisé. Les temps et pourcentages d'élution sont les mêmes que ceux du tableau 21 (gradient B analytique). Les débits pour le mode semi-préparatif et préparatif ont été fixés par rapport aux données fournies par le fabricant de colonne. Ces données apparaissent dans le tableau 23. Il indique les débits typiques à appliquer en fonction de la granulométrie, de la longueur et du diamètre interne de la colonne utilisée. La pression du système ne doit pas dépasser 3500 Psi, afin de ne pas endommager les colonnes. A partir de ces données, le débit appliqué pour le mode semi-préparatif a été fixé à 5ml.min⁻¹ et pour le mode préparatif à 10 ml.min⁻¹.

Tableau 23 : Débits recommandés par Phenomenex pour l'utilisation des différents types de colonne

Taille des particules	Diamètre interne	Débit typique	Pression typique (colonne 250 mm)
(μm)	(mm)	($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	(Psi)
10	4,6	1	590
5	10,0	5	1250
10	21.2	20	280

Les volumes d'injection pour la purification ont été fixés selon les recommandations du fabricant des colonnes de CLHP qui apparaissent dans le tableau 24. Les volumes injectés vont de 100 à 500 μl en mode semi-préparatif et de 500 à 1000 μl en mode préparatif. Le volume le plus important est fixé en fonction de la pression du système qui ne doit pas dépasser 3500 Psi.

Tableau 24 : Quantité d'échantillon pouvant être séparé selon les types de colonne

Type de colonne	Diamètre interne (mm)	Quantité typique et (maximum) d'échantillon injecté (mg)	Volume typique et (maximum) d'échantillon injecté (μl)
Analytique	4,6	0,1 (2,5)	10 (200)
Semi-préparative	10,0	1,0 (25)	50 (10000)
Préparative	20,0	5,0 (500)	200 (5000)

2.5 EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA METHODE DE PURIFICATION

L'efficacité de la méthode de purification est évaluée en calculant la résolution entre les différents pics du chromatogramme, selon l'équation 2.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 DEVELOPPEMENT DU GRADIENT ANALYTIQUE

Une bonne résolution entre les pics d'un même chromatogramme est indispensable pour pouvoir doser précisément une espèce dans le mélange. L'analyse du spectre d'absorption d'un pigment (réalisée dans le chapitre 2 pour la violaxanthine), n'est possible que si l'espèce étudiée n'est pas co-éluee avec d'autres molécules.

3.1.1 Extrait de *Dunaliella tertiolecta*

Le premier gradient utilisé en CLHP a été le gradient A. Pour l'extrait acétonique de *D. tertiolecta*, le chromatogramme à 435 nm obtenu pour ce gradient est présenté sur la figure 86.

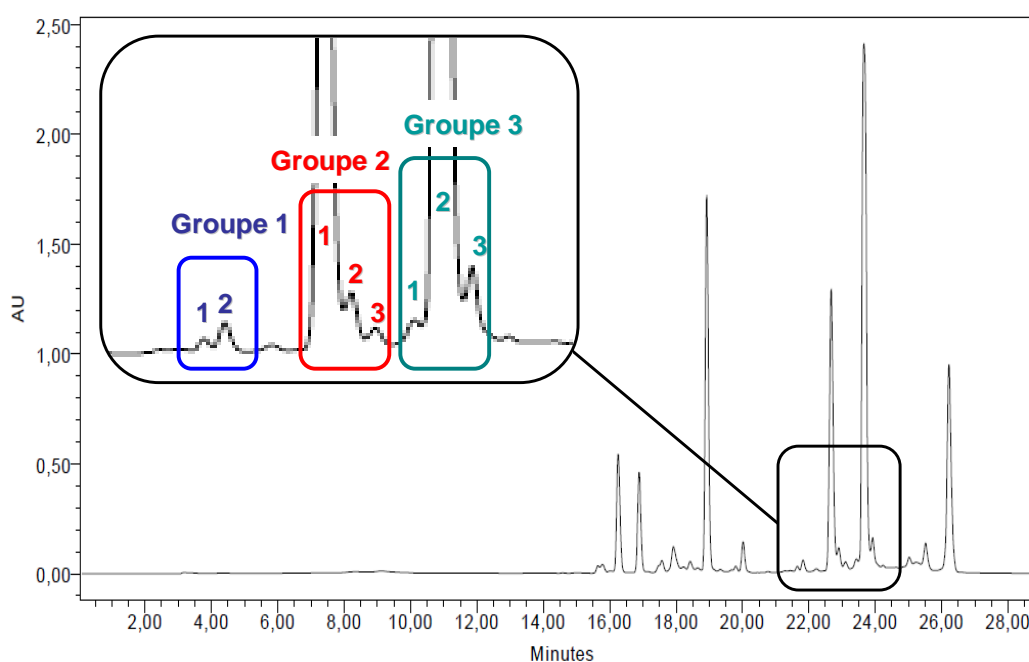


Figure 86 : Chromatogramme de l'extrait acétonique de *Dunaliella tertiolecta*, à 435nm, obtenu en mode analytique

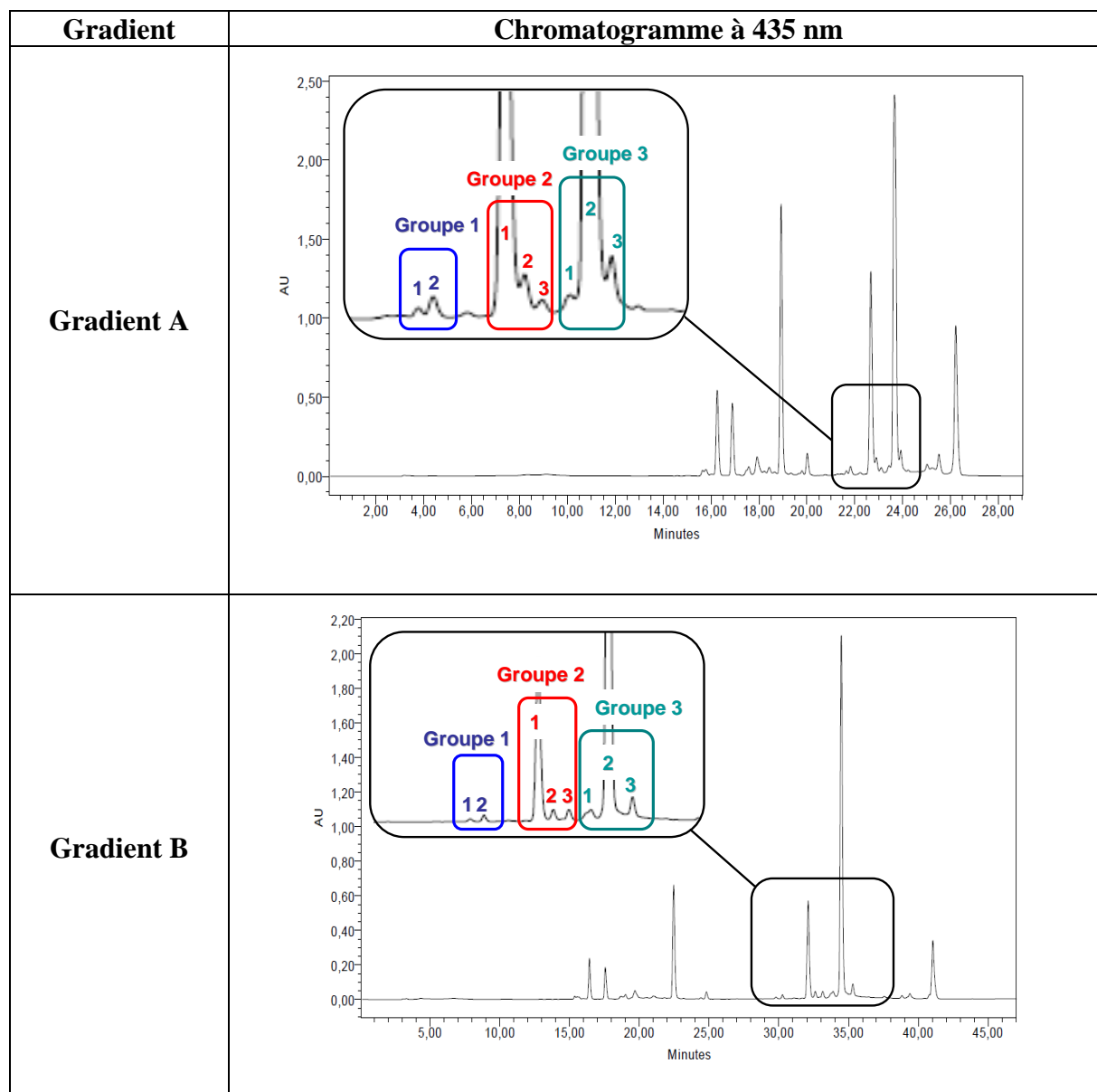
Ce chromatogramme montre que les espèces qui ont un temps de rétention compris entre 22 et 26 minutes sont mal séparées. La résolution entre ces espèces doit être améliorée. Le gradient B a été développé suite à ce résultat.

Sur le chromatogramme du gradient A, des groupes de molécules ont été définis. Ils apparaissent sur la figure 86. Le groupe 1 est composé de deux pics, le groupe 2 de trois pics et le groupe 3 de trois pics.

L'amélioration apportée par le gradient B est vérifiée en calculant la résolution entre les différentes molécules mal résolues pour le gradient A.

Le tableau 25 présente les chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de *D. tertiolecta*, obtenus avec les gradients A et B. Avec le gradient B, les molécules qui étaient précédemment mal résolues apparaissent mieux séparées, pour les trois groupes de molécules. Ce résultat visuel est à confirmer par le calcul des résolutions. Les différentes valeurs calculées sont présentées dans le tableau 26.

Tableau 25 : Comparaison entre les gradients A et B des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de *Dunaliella tertiolecta* obtenus en mode analytique



Le tableau 26 présente les résolutions calculées entre les pics des différents groupes, pour l'extrait acétonique de *D. tertiolecta*. Avec le gradient A, la résolution entre les différents pics est inférieure à 1. La résolution entre les pics 1 et 2 du groupe 1, entre les pics 1 et 2 du groupe 2 et entre les pics 1 et 2 du groupe 3 est inférieure à 0,8. La séparation est insuffisante.

Tableau 26 : Comparaison entre le gradient A et B des résolutions obtenues entre les différents pics des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de *Dunaliella tertiolecta*

N° Pic	Temps de rétention (min)		Résolution entre les pics	
	A	B	A	B
0	3,18	3,10		
Groupe 1				
1	21,65	29,80		
2	21,83	30,26	0,57	3,30
Groupe 2				
1	22,67	32,10		
2	22,90	32,62	0,74	1,79
3	23,10	33,14	0,83	1,84
Groupe 3				
1	23,43	33,89		
2	23,66	34,47	0,43	0,69
3	23,92	35,50	0,86	2,30

Les résultats obtenus pour le gradient B montrent que les pics sont mieux séparés. La résolution entre les différentes espèces est améliorée et est supérieure à 1, à l'exception de la résolution entre les pics 1 et 2 du groupe 3 qui est inférieure à 1.

Le gradient B est plus adapté pour séparer les pigments présents dans l'extrait acétonique de *D. tertiolecta*.

3.1.2 Extrait de *Cylindrotheca closterium*

Le chromatogramme à 435 nm obtenu pour le gradient A et l'extrait acétonique de *C. closterium* est présenté sur la figure 87.

Ce chromatogramme montre que les espèces qui ont un temps de rétention compris entre 17 et 25 minutes sont mal séparées. La résolution entre ces espèces doit être améliorée. Le gradient B a été utilisé sur cet extrait.

Sur le chromatogramme du gradient A, des groupes de molécules ont été définis. Ils apparaissent sur la figure 87. Le groupe 1 est composé de deux pics et le groupe 2 de trois pics.

L'amélioration apportée par le gradient B est vérifiée en calculant la résolution entre les différentes molécules mal résolues avec le gradient A.

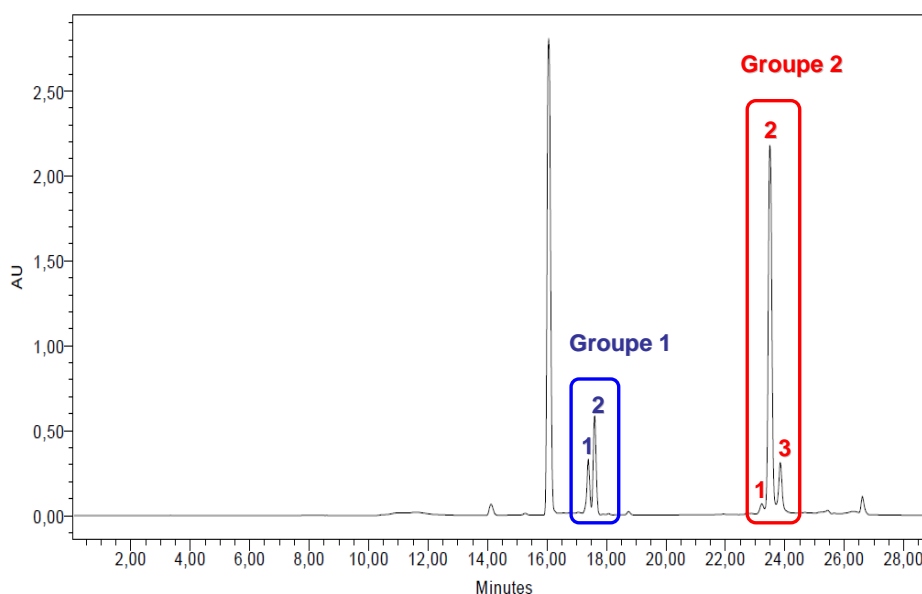
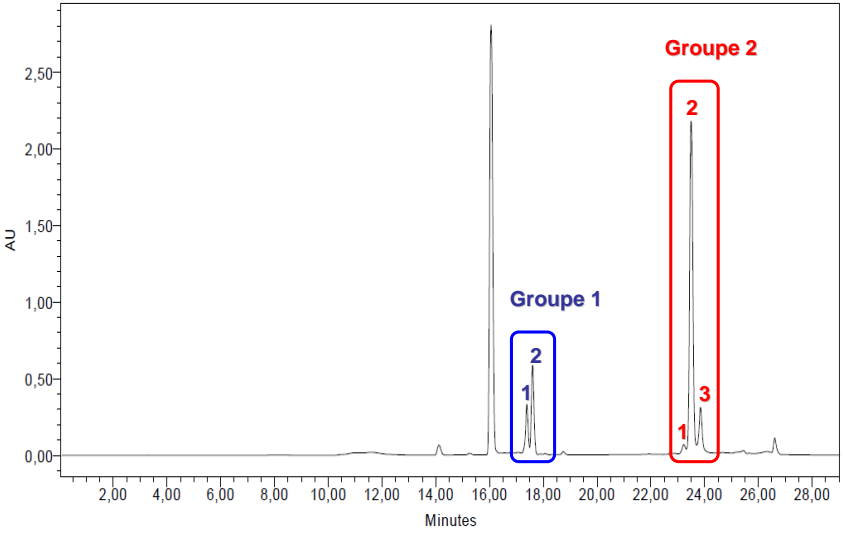
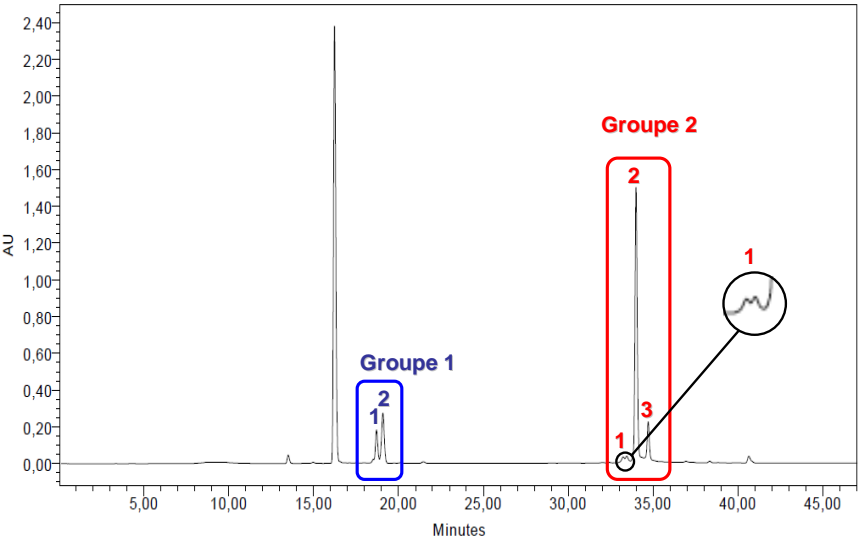


Figure 87 : Chromatogramme de l'extrait acétonique de *Cylindrotheca closterium*, à 435nm, obtenu en mode analytique

Le tableau 27 présente les chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de *C. closterium* obtenus avec les gradients A et B. Avec le gradient B, les molécules qui étaient précédemment mal résolues apparaissent mieux séparées, pour les deux groupes de molécules. Concernant le groupe 2, le pic 1 se divise en 2 espèces avec le gradient B. Elles seront appelées 1a et 1b. Ce résultat montre que le gradient B permet de visualiser des espèces qui étaient co-éluees avec le gradient A.

Le gradient B est plus adapté pour séparer les espèces présentes dans l'extrait acétonique de *C. closterium*. Ce résultat visuel est à confirmer par le calcul des résolutions entre les pics. Les différentes valeurs calculées sont présentées dans le tableau 28.

Tableau 27 : Comparaison entre les gradients A et B des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de *Cylindrotheca closterium*, obtenus en mode analytique

Gradient	Chromatogramme à 435 nm
Gradient A	
Gradient B	

NB : pour le gradient B et le groupe 2, la résolution sera calculée entre les pics 1b et 2.

Le tableau 28 présente les résolutions calculées entre les pics des différents groupes, pour l'extrait acétonique de *C. closterium*. Avec le gradient A, la résolution entre les différents pics est inférieure à 1. La résolution entre les pics 1 et 2 du groupe 1 et entre les pics 1 et 2 du groupe 2 est inférieure à 0,8. La séparation est insuffisante.

Tableau 28 : Comparaison entre le gradient A et B, des résolutions obtenues entre les différents pics des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de *Cylindrotheca closterium*

N° Pic	Temps de rétention (min)		Résolution entre les pics	
	A	B	A	B
0	3,34	3,35		
Groupe 1				
1	17,40	18,71		
2	17,60	19,08	0,71	0,90
Groupe 2				
1	23,23	33,45		
2	23,50	33,90	0,51	1,07
3	23,85	34,71	0,98	1,72

Les résultats obtenus pour le gradient B montrent que les pics sont mieux séparés. La résolution entre les différentes espèces est améliorée et est supérieure à 1, à l'exception de la résolution entre les pics 1 et 2 du groupe 1 qui est inférieure à 1.

Le gradient B est plus adapté pour séparer les pigments présents dans l'extrait acétonique de *C. closterium*.

3.1.3 Processus de développement de la méthode analytique

Les résultats montrent que le gradient A ne permet pas d'obtenir une résolution suffisante entre tous les pics du chromatogramme.

$$R_s = \frac{1}{4} \times \underbrace{\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)}_{\text{I}} \times \underbrace{\left(\frac{k_2}{1+k_2}\right)}_{\text{II}} \times \underbrace{(N_2)^{1/2}}_{\text{III}}$$

Équation 3 : Calcul de la résolution

Selon l'équation 3, pour accroître la résolution, il faut augmenter l'un des facteurs **I** (sélectivité), **II** (rétention des solutés), **III** (efficacité de la colonne).

Facteur de séparation (α)

Le facteur de séparation correspond au rapport : $\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0}$

Le facteur de séparation mesure les différences de distribution de deux substances entre les deux phases. Elle intervient dans le calcul de la résolution par l'intermédiaire du terme **I**. De faibles variations de α (valeur numérique proche de l'unité) entraînent de grands changements de la valeur de **I**.

La sélectivité est fonction des coefficients de distribution des constituants du mélange à analyser. Elle peut être modifiée (Rosset *et al.*, 1991):

- en changeant la nature et la composition de la phase mobile,
- en changeant la nature de la phase stationnaire,
- en modifiant la température.

Dans le cadre de l'étude en cours, une modification de la phase mobile est à envisager.

Facteur de rétention (k)

Le paramètre **II** intervenant dans l'expression de la résolution dépend du facteur de capacité.

Il correspond au rapport : $k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$.

La résolution augmente en même temps que ce facteur. Pour augmenter la valeur de ce rapport, il faut donc augmenter la valeur de t_r . Cependant le gain de résolution est négligeable pour des valeurs de k allant de 5 à 10, le temps d'analyse est inutilement augmenté par rapport à l'amélioration de la résolution. Il faut donc trouver un compromis entre l'obtention d'une

bonne résolution, qui exige une forte rétention des composés, et l'obtention d'une analyse rapide qui exige précisément le contraire (Rosset *et al.*, 1991).

Pour un bon compromis, le facteur de capacité doit être compris entre 1 et 10 dans le cas des mélanges complexes (entre 2 et 5 en général) (Rosset *et al.*, 1991).

Efficacité (N)

L'efficacité correspond à la formule :
$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{\omega_{\tan}} \right)^2$$

Le nombre de plateaux théoriques de la colonne est le dernier paramètre intervenant dans l'expression de la résolution. Bien que doubler N_2 revient à multiplier seulement d'un facteur 1,4 R_S , augmenter le nombre de plateaux théoriques est souvent un moyen d'améliorer la résolution.

L'efficacité de la colonne peut être améliorée en modifiant (Rosset *et al.*, 1991) :

- la vitesse de la phase mobile,
- la granulométrie de la phase stationnaire,
- la nature du soluté et du couple phase stationnaire/phase mobile,
- les caractéristiques géométriques de la colonne.

Le gradient A présente une résolution insuffisante pour séparer correctement toutes les espèces contenues dans les extraits des deux espèces de microalgues modèles. Il a donc été modifié à partir des informations fournies par l'équation 3.

Pour augmenter le facteur de capacité, la durée entre les différentes étapes du gradient a été allongée afin d'améliorer la rétention des différents composés sur la phase stationnaire.

Puis, une étape a été ajoutée au gradient. Elle consiste en l'application d'un flux du solvant C (acétate d'éthyle). Ce solvant est plus hydrophobe que les autres éluants. Cette opération vise à obtenir une bonne séparation des molécules très hydrophobes et permet d'augmenter la sélectivité.

Ces différentes modifications ont permis d'aboutir au gradient B.

3.2 EFFICACITE DE LA METHODE DE PURIFICATION

Une bonne résolution est indispensable pour purifier par CLHP les molécules d'intérêt. Des pics dont la résolution est inférieure à 0,8 sont insuffisamment séparés. Lors de la purification cela se traduira par une contamination de l'espèce désirée par une autre. Pour améliorer la pureté de la molécule voulue, il faudra procéder à une autre étape de purification. L'ajout d'une étape de purification est à l'origine de la diminution du rendement de purification de l'espèce désirée. Dans le cadre de la recherche en produit naturel, il faut que les quantités récupérées soient assez importantes pour pouvoir réaliser les étapes de caractérisation et les études pharmacologiques. L'obtention d'une molécule pratiquement pure lors d'un premier passage en CLHP est la configuration idéale en termes de rendement de purification mais aussi en termes de temps.

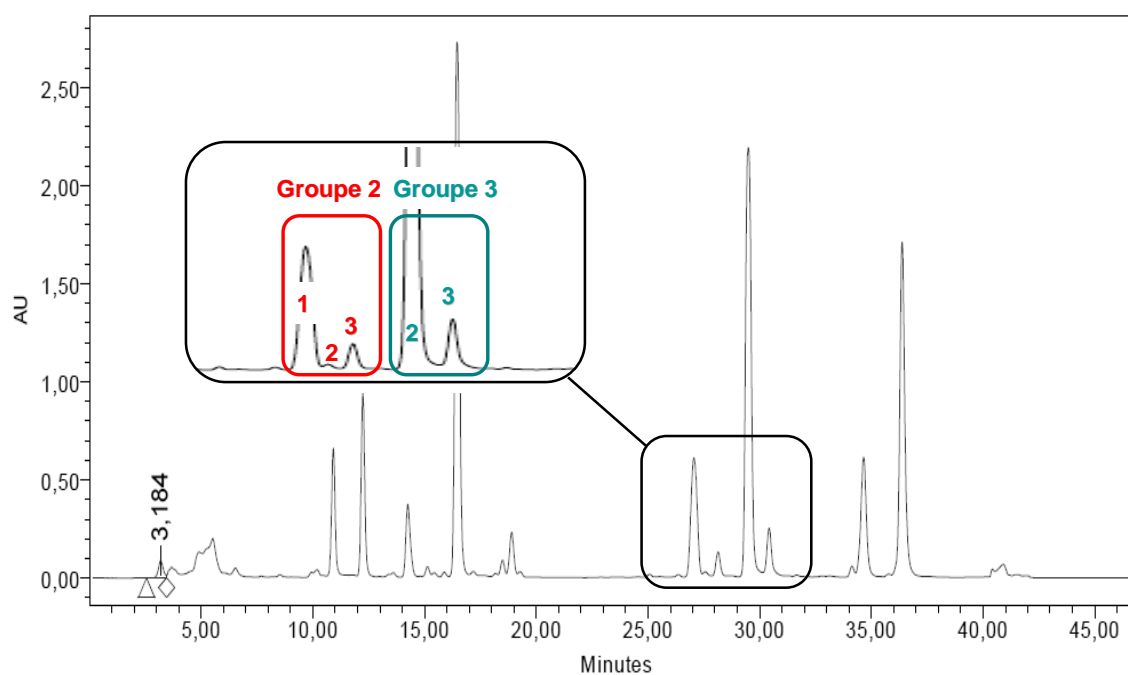


Figure 88 : Chromatogramme à 435 nm de l'extrait dichlorométhanique de *Dunaliella tertiolecta* obtenu en mode semi-préparatif. Les groupes de molécules définis sont les mêmes que ceux définis dans le tableau 23 pour l'extrait acétonique de *Dunaliella tertiolecta*

La figure 88 présente le chromatogramme obtenu à 435 nm pour l'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta*, obtenu selon le gradient B et adapté au mode semi-préparatif. Il s'agit de l'extrait qui a été utilisé lors de la recherche bioguidée de molécules anticancéreuses (Cf. chapitre 2). Les groupes définis sur ce chromatogramme sont les mêmes que ceux définis pour l'extrait acétonique de *D. tertiolecta* (Cf. figure 86). Le groupe 1 n'est

pas représenté sur la figure 88. Les espèces de ce groupe sont ici extrêmement minoritaires et le calcul des résolutions entre les pics n'est donc pas possible.

La figure 88 montre que le pic 1 du groupe 3 est coélué avec le pic 2 de ce même groupe. Il y a perte de résolution entre le passage du mode analytique au mode semi-préparatif.

Le tableau 29 compare les résolutions entre les pics obtenus pour l'extrait acétonique de *D. tertiolecta* en mode analytique avec celles de l'extrait obtenu en mode semi-préparatif. Ce tableau indique que les résolutions calculées pour le mode semi-préparatif sont supérieures à 1 (sauf pour le pic 1 du groupe 3). Les molécules sont bien séparées.

Malgré la perte de résolution observée et l'observation d'une co-élution, le mode semi-préparatif est utilisable pour purifier les pigments de microalgues marines.

NB : Les différences observées dans les temps de rétention sont dues au changement de colonne (passage de mode analytique au mode semi-préparatif).

Tableau 29 : Comparaison entre le mode analytique et le mode semi-préparatif des résolutions obtenues entre les différents pics des chromatogrammes à 435 nm de l'extrait acétonique de *Dunaliella tertiolecta*, pour le gradient B

N° Pic	Temps de rétention (min)		Résolution entre les pics	
	Analytique	Semi-préparative	Analytique	Semi-préparative
0	3,098	3,184		
Groupe 1				
1	29,796			
2	30,261		3,30	
Groupe 2				
1	32,101	27,057		
2	32,615	27,566	1,79	1,34
3	33,144	28,138	1,84	1,50
Groupe 3				
1	33,89			
2	34,474	29,491	0,69	
3	35,503	30,424	2,30	2,45

4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La standardisation des méthodes d'analyse et de purification permet :

- un gain de temps pour l'opérateur,
- une augmentation des rendements de purification.

Une bonne connaissance des caractéristiques du gradient d'élution, ainsi que la connaissance des propriétés optiques des pigments facilitent l'étude des chromatogrammes. Les caroténoïdes et les chlorophylles (en incluant les phéopigments) possèdent des spectres d'absorption caractéristiques et des propriétés physico-chimiques différentes.

L'utilisation du détecteur PDA permet de déterminer la classe d'un pigment et d'orienter son identification. Le spectre d'absorption ne donne qu'une indication qu'il conviendra de confirmer par les analyses spectroscopiques usuelles telles de la RMN, l'infra-rouge (IR) et la spectrométrie de masse haute résolution.

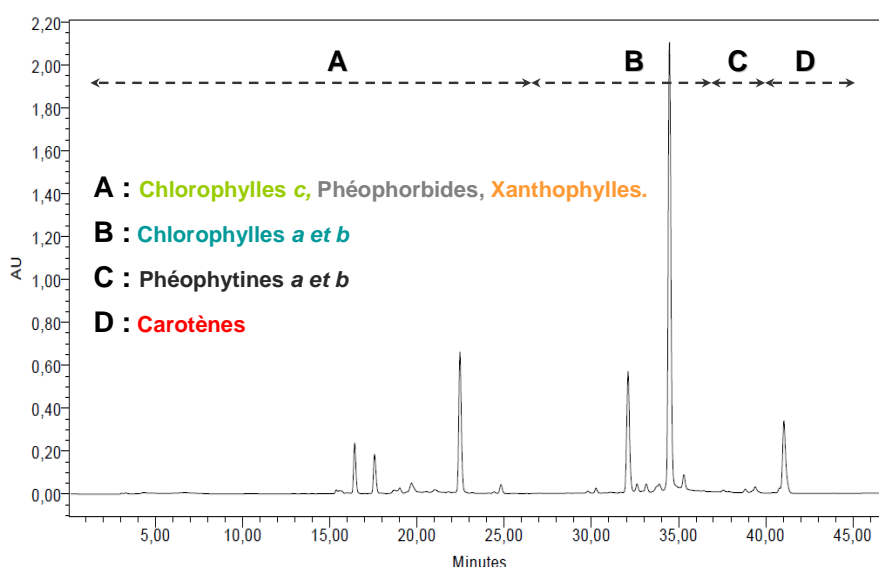


Figure 89 : Représentation schématique de la répartition sur le chromatogramme des pigments de microalgues marines, selon le gradient B, mode analytique à 435 nm. (Chromatogramme : extrait acétonique de *D. tertiolecta*)

La figure 89 est une représentation schématique de la répartition des différentes familles de pigments sur le chromatogramme. Cette figure est le résultat des observations réalisées lors du travail d'analyse confrontées aux données bibliographiques fournies par Jeffrey *et al* (1997). Les pigments les plus polaires ont les temps de rétention les plus faibles. L'ensemble de ces données permet une analyse plus rapide et donne une indication importante quant à la composition pigmentaire de l'extrait de microalgue marine.

Comme défini dans la section 1 de ce chapitre, il était important de développer des méthodes d'analyse et de purification des xanthophylles.

Dans cette section, à partir d'une méthode d'analyse préexistante et appliquée à l'écologie marine, nous avons mis en place des méthodes d'analyse et de purification qui nous permettent :

- de doser les pigments dans les extraits de microalgues,
- d'orienter l'identification des pigments de type caroténoïde,
- de purifier les pigments présents dans les extraits de manière simple et efficace.

Ce travail doit permettre à l'avenir de pouvoir évaluer le potentiel antiprolifératif de xanthophylles issus de microalgues originales sur différentes lignées cellulaires cancéreuses.

SECTION 3: DEVELOPPEMENT DE PROCEDES D'EXTRACTION DE PIGMENTS ISSUS DE MICROALGUES MARINES

1 LES METHODES D'EXTRACTION DE PRINCIPES ACTIFS

1.1 CRITERES DE SELECTION D'UNE METHODE D'EXTRACTION

Les paramètres les plus importants conduisant à la sélection d'une méthode d'extraction sont généralement liés :

- aux caractéristiques biochimiques de la molécule,
- à la rapidité de la méthode d'extraction,
- aux quantités de solvants utilisées,
- à la reproductibilité et à la répétabilité de la technique,
- aux rendements d'extraction obtenus,
- à la limitation de la dégradation des molécules extraites,
- au dimensionnement, au coût et à la facilité du procédé.

(Wang & Weller, 2006; Rodríguez-Bernaldo de Quirós & Costa, 2006)

1.2 METHODES D'EXTRACTION UTILISEES CHEZ LES VEGETAUX ET LES MICROALGUES MARINES

Les méthodes d'extraction classiques comme la macération, la percolation, ou encore la méthode de Soxhlet utilisent des solvants organiques. Ces méthodes sont répandues pour l'extraction des pigments ou des lipides à partir de végétaux. Ces procédés reproductibles permettent une extraction rapide des molécules mais impliquent l'utilisation de grandes quantités de solvants et peuvent entraîner la dénaturation ou transformation chimique des molécules d'intérêt (Wang & Weller, 2006).

Associer la distillation ou de l'eau chaude à la macération en solvant augmente les rendements d'extraction pour les huiles essentielles ou les composés bioactifs provenant de plantes, mais engendre la dégradation des molécules thermolabiles (Manzan *et al.*, 2003).

D'autres technologies utilisent des enzymes comme les xylanases, les pectinases ou encore les cellulases pour améliorer le rendement d'extraction des pigments et ont été validées pour les plantes supérieures (Choudhari & Ananthanarayan, 2007; Kim *et al.*, 2005) et les macroalgues (Deniaud *et al.*, 2003). L'utilisation des enzymes pourraient être intéressantes pour les microalgues marines non frustulées. En effet, la paroi de certaines microalgues est

constituée de cellulose, xylanes ou mannanes comme chez les glaucophytes, les algues rouges, les algues vertes ou les dinophytes. (de Reviers, 2002).

Certaines techniques, visant à limiter les transformations chimiques au cours de l'extraction, ont été proposées. Les échantillons utilisés peuvent être congelés (à -80°C, ou par l'utilisation d'azote liquide), lyophilisés, ou stockés en atmosphère saturée en eau afin de limiter l'oxydation ou la dénaturation thermique (Esteban *et al.*, 2009). La macération en azote liquide, suivie d'une extraction dans un tampon, permet la précipitation des biliprotéines (pigments protéiques) (Sachindra *et al.*, 2005). Cette technique a été décrite pour l'extraction de la phycocyanine chez les cyanobactéries. Cependant, des étapes de dialyse et chromatographiques supplémentaires (filtration sur gel) sont nécessaires pour purifier la protéine.

Les extractions en solution aqueuse impliquent un contrôle strict du pH. Les porphyrines (chlorophylles et phéopigments) peuvent en effet subir des transformations chimiques dans des conditions acides ou alcalines. Les chlorophylles peuvent s'épimériser, se déphytyller (obtention de chlorophyllides ou phéophorbides) ou bien se démétaller (obtention de phéophytines ou phéophorbides) (Jeffrey *et al.*, 1997). La présence de chlorophyllases (responsables de la déphytylation des chlorophylles) dans les extraits microalgaux explique également la rapide dégradation des pigments chlorophylliens (Barrett & Jeffrey, 1964; Barrett & Jeffrey, 1971; Karboune *et al.*, 2005).

Différents travaux ont été consacrés à l'extraction des pigments de microalgues marines. Des techniques très innovantes, comme celle proposée par Hejazi *et al.* (2002), reposent sur l'utilisation de solvants dont le Log (P) est supérieur à 6, pour extraire sélectivement les caroténoïdes de *Dunaliella salina*, tout en préservant la viabilité de la cellule microalgale (Hejazi *et al.*, 2002).

Cette étude est une exception. La majorité des méthodes d'extraction est destructive pour les microalgues, comme le « bead beating » ou la sonication (Rostagno *et al.*, 2007), de même que les méthodes consistant à réaliser un choc osmotique permettant la libération dans le milieu extérieur du contenu intracellulaire de la microalgue. Ce traitement ne s'est pas montré efficace avec les microalgues marines frustulées (Jeffrey *et al.*, 1997).

L'extraction par CO₂ supercritique pour extraire des lipides, des pigments ou des composés bioactifs à partir de plantes (Jaren-Galan *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005) ou de microalgues a été décrite comme très efficace, malgré son coût élevé (Klejdus *et al.*, 2009; Macías-Sánchez *et al.*, 2005; Macías-Sánchez *et al.*, 2007; Macías-Sánchez *et al.*, 2009a; Macías-Sánchez *et al.*, 2009b; Mendes *et al.*, 2003; Mendiola *et al.*, 2007). Par exemple, les pigments contenus dans le paprika (Rutkowska J, 2009) et chez *Lithospermum* sont rapidement et facilement extraits par l'utilisation de CO₂ supercritique (Jaren-Galan *et al.*, 1999).

Pour notre étude et à partir de l'ensemble de ces travaux, nous avons décidé de choisir des méthodes d'extraction classiques comme la macération et l'extraction assistée par ultra-son ainsi que des procédés d'extraction innovants comme l'extraction sous irradiation micro-onde.

1.3 LES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION SELECTIONNEES POUR L'ETUDE

1.3.1 Macération

La macération est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des pigments de microalgues marines. Elle est simple et très avantageuse lorsqu'il faut préparer un grand nombre d'échantillons pour des dosages spectrophotométriques. Les temps d'extraction usuels vont de 10 minutes dans le DMSO à 65°C, à 12h dans de l'acétone 90%. Ces durées d'extraction peuvent être à l'origine de l'isomérisation ou de la dégradation des pigments (Jeffrey *et al.*, 1997). Malgré des temps d'extraction étendus et des risques de modifications chimiques, la macération est une méthode de référence à laquelle il est possible de comparer d'autres méthodes d'extraction.

1.3.2 UAE (Ultrasound Assisted Extraction)

Les ultrasons sont connus pour détruire les cellules en formant des dépressions et surpressions locales dans le solvant. La pression peut atteindre localement $2 \cdot 10^7$ hPa et à ces endroits la température instantanée peut être 10000 K, ce qui génère des ondes transmises sur des distances de quelques micromètres à l'ensemble du milieu (Jeffrey *et al.*, 1997). L'efficacité des ultrasons est variable d'un type d'appareillage à un autre. Il a été démontré qu'ils conduisaient à un chauffage important du milieu et qu'ils pouvaient être à l'origine de la dégradation des pigments. Cependant, les ultrasons restent une méthode classique pour extraire les pigments (Jeffrey *et al.*, 1997).

1.3.3 MAE (Microwaves Assisted extraction)

Durant les dix dernières années, les méthodes d'extraction sous irradiation micro-ondes ont connu un intérêt croissant. La MAE et la VMAE (Vacuum Microwaves Assisted Extraction) se sont montrées efficaces et rapides pour extraire des antioxydants (Xiao *et al.*, 2009) ou bien des pigments issus de plantes (Wang *et al.*, 2008), ou encore des huiles végétales (Cravotto *et al.*, 2008). Ces techniques permettent de réduire la consommation de solvants et le temps d'extraction pour des rendements équivalents ou supérieurs par rapport aux techniques d'extraction classiques. La MAE et la VMAE ont été appliquées à des microalgues marines pour en extraire des lipides et ont permis d'obtenir de bons rendements d'extraction pour les chlorophytes *Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris*, et *Scenedesmus sp.* (Lee *et al.*, 2010).

Dans le domaine des méthodes d'extraction, la MAE et la VMAE sont donc des procédés innovants qui montrent une réelle efficacité. Or ces méthodes n'ont jamais été évaluées pour l'extraction de pigments issus de microalgues marines.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 EXTRACTION DES PIGMENTS

2.1.1 Paramètres communs à toutes les méthodes d'extraction

50 mg de microalgues marines lyophilisées ont été utilisés pour chaque extraction. Le volume d'acétone utilisé est de 30 ml. Chacune des extractions est effectuée en triplicat. Toutes les extractions sont réalisées sous agitation magnétique (excepté pour l'UAE où l'agitation est générée par les ultrasons), à l'abri de la lumière et sous atmosphère inerte d'argon (excepté pour la VMAE réalisée sous vide partiel), afin de limiter la photo-oxydation des pigments.

2.1.2 Paramètres propres à chacune des méthodes d'extraction

2.1.2.1 Macération à température ambiante

La macération à température ambiante (20°C) est réalisée dans un erlenmeyer de 50 ml, pour des temps allant de 1 à 120 minutes.

2.1.2.2 Macération à chaud

Le milieu est porté à ébullition du solvant à l'aide d'un montage à reflux constitué d'un ballon et d'un réfrigérant, de 1 à 120 minutes. La température du milieu est fixée par la température d'ébullition de l'acétone, qui est de 56°C à pression atmosphérique.

2.1.2.3 Extraction sous irradiation micro-onde (MAE : *Microwaves Assisted Extraction*)

La MAE est réalisée dans un ballon de 100 ml, placé dans un réacteur sous irradiation micro-onde (CEM Discovery), pour des durées allant de 3 à 15 minutes et pour des puissances allant de 25 à 100W. Le système est constitué d'un réfrigérant connecté au ballon afin de permettre le reflux du solvant dans le milieu. La température du milieu est fixée par la température d'ébullition de l'acétone, qui est de 56°C sous pression atmosphérique, le reflux est observé pour toutes les puissances utilisées.

2.1.2.4 Extraction sous irradiation micro-onde sous vide (VMAE : *Vacuum Microwaves Assisted Extraction*)

La VMAE est réalisée dans les mêmes conditions que la MAE, sauf qu'une pompe est reliée au système afin de pouvoir travailler sous vide partiel (Cf. figure 90). La pression moyenne relevée pour l'ensemble des extractions réalisées est de 26697 ± 1144 Pa. La température du milieu est fixée par la température d'ébullition de l'acétone, qui est de 22°C à cette pression. Le reflux est observé pour toutes les puissances utilisées.

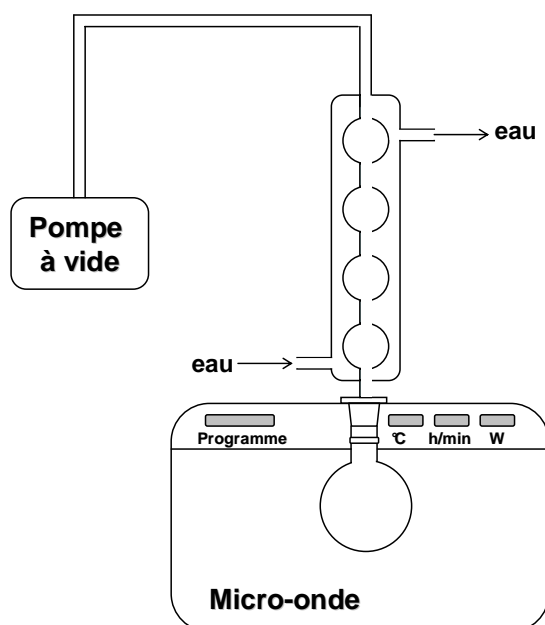


Figure 90 : Schéma de l'extraction de pigments par VMAE

2.1.2.5 Extraction assistée par Ultrason (UAE : Ultrasound Assisted Extraction)

L'UAE est réalisée dans les conditions classiquement décrites pour l'extraction des pigments (Jeffrey *et al.*, 1997). Une sonde à ultrasons est plongée dans l'échantillon, ce dernier est thermostaté par un bain de glace. Il limite l'échauffement du milieu provoqué par la formation d'un point chaud à l'extrémité de la sonde à ultrasons. Cette augmentation intense de la température peut générer la dégradation des pigments. Pour l'étude, les ultrasons ont été appliqués de manière continue de 3 à 15 minutes et pour des puissances allant de 4,3 à 12,2 W (12,2W : puissance maximale délivrée par l'appareil). La température moyenne relevée après extraction est de 8,5°C.

2.2 TRAITEMENT DES EXTRAITS POUR ANALYSES**Etape 1 : Filtration et récupération des microalgues**

L'extrait est filtré sur une membrane PVDF de filtration 0,2 µm afin d'éliminer les débris cellulaires. Le marc est séché à 4°C pendant 24h, puis conservé à 4°C jusqu'à son analyse en microscopie électronique à balayage.

Etape 2 : Concentration du filtrat

Le solvant du filtrat est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C sous vide. Puis l'extrait sec est solubilisé dans 5 ml d'acétone. L'extrait concentré est analysé en CLHP afin de déterminer les rendements d'extraction des pigments.

NB : Afin de contrôler l'effet de la filtration du milieu sur la quantité de pigments extraite, 50 mg de microalgues lyophilisées sont déposés sur la membrane filtrante. Les pigments sont extraits en filtrant directement 30 ml d'acétone sur les cellules. Le solvant est retiré à l'aide d'un évaporateur rotatif puis les pigments sont solubilisés dans 5 ml d'acétone. Cet extrait de référence correspond à une macération à température ambiante et à temps initial.

2.3 EVALUATION DE L'EFFICACITE DES METHODES D'EXTRACTION

2.3.1 Intégrité des cellules de microalgues marines: Utilisation de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

L'intégrité des cellules microalgales est évaluée :

- après la lyophilisation
- après la filtration qui suit chaque méthode d'extraction.

Les échantillons sont placés sur support constitué d'une bicouche de carbone conductrice et examinés par un microscope électronique à balayage Philips-FEI Quanta 200 ESEM/FEG, utilisé en mode environnemental, équipé d'un canon FEG délivrant un faisceau d'électrons de 1 à 30 keV.

2.3.2 Rendement d'extraction des pigments : dosage par CLHP

2.3.2.1 Sélection des pigments à doser

La chlorophylle *a* et la fucoxanthine sont les pigments dosés chez *C. closterium* pour évaluer les rendements d'extraction. La chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* et le β,β -carotène sont les pigments dosés chez *D. tertiolecta* pour évaluer les rendements d'extractions. Les étalons de chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et de β,β -carotène ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich. Les étalons de fucoxanthine et de phéophytine *a* ont été obtenus auprès de DHI Lab Product, Danemark.

2.3.2.2 Dosage des pigments et calcul du rendement d'extraction

Méthode de dosage utilisée

Les pigments présents dans l'extrait sont dosés par CLHP juste après chaque extraction. La CLHP est utilisée en mode analytique et les différents pigments étudiés sont dosés à la longueur d'onde de 435 nm. Le système est thermostaté à 20°C. Le débit appliqué est de 1ml.min⁻¹, la phase mobile est constituée de trois solvants : méthanol/eau (80/20), acétonitrile/eau (90/10) et acétate d'éthyle. La phase stationnaire est une colonne Phenomenex Luna C₁₈(2) (250 mm x 4,6 mm, 10 µm). Le gradient utilisé est présenté dans le tableau 30.

Tableau 30 : Gradient, débit et colonne utilisés pour l'analyse des extraits de microalgue

Temps (min)	Débit (ml/min)	%a	%b	%c
0	1	100	0	0
3	1	0	100	0
35	1	0	30	70
38	1	0	0	100
41	1	0	0	100
43	1	0	100	0
45	1	100	0	0
47	1	100	0	0

Avec a : méthanol/eau (80/20)

Avec b : acétonitrile/eau (90/10)

Avec c : acétate d'éthyle

Colonne mode analytique : Phenomenex Luna C₁₈(2) (250 mm x 4,6 mm, 10 µm)

Dosage des pigments présents dans les extraits

Le volume d'extrait injecté en CLHP est de 5 et 10 µl. Deux injections sont réalisées pour chacun des deux volumes injectés. Les pigments sont identifiés en comparant leur temps de rétention avec ceux obtenus pour les étalons. Le rendement d'extraction pour chacun des pigments est calculé à partir des droites d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en µg de pigment par mg de biomasse lyophilisée.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 INTEGRITE DES CELLULES DE MICROALGUES MARINES: UTILISATION DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)

Cylindrotheca closterium

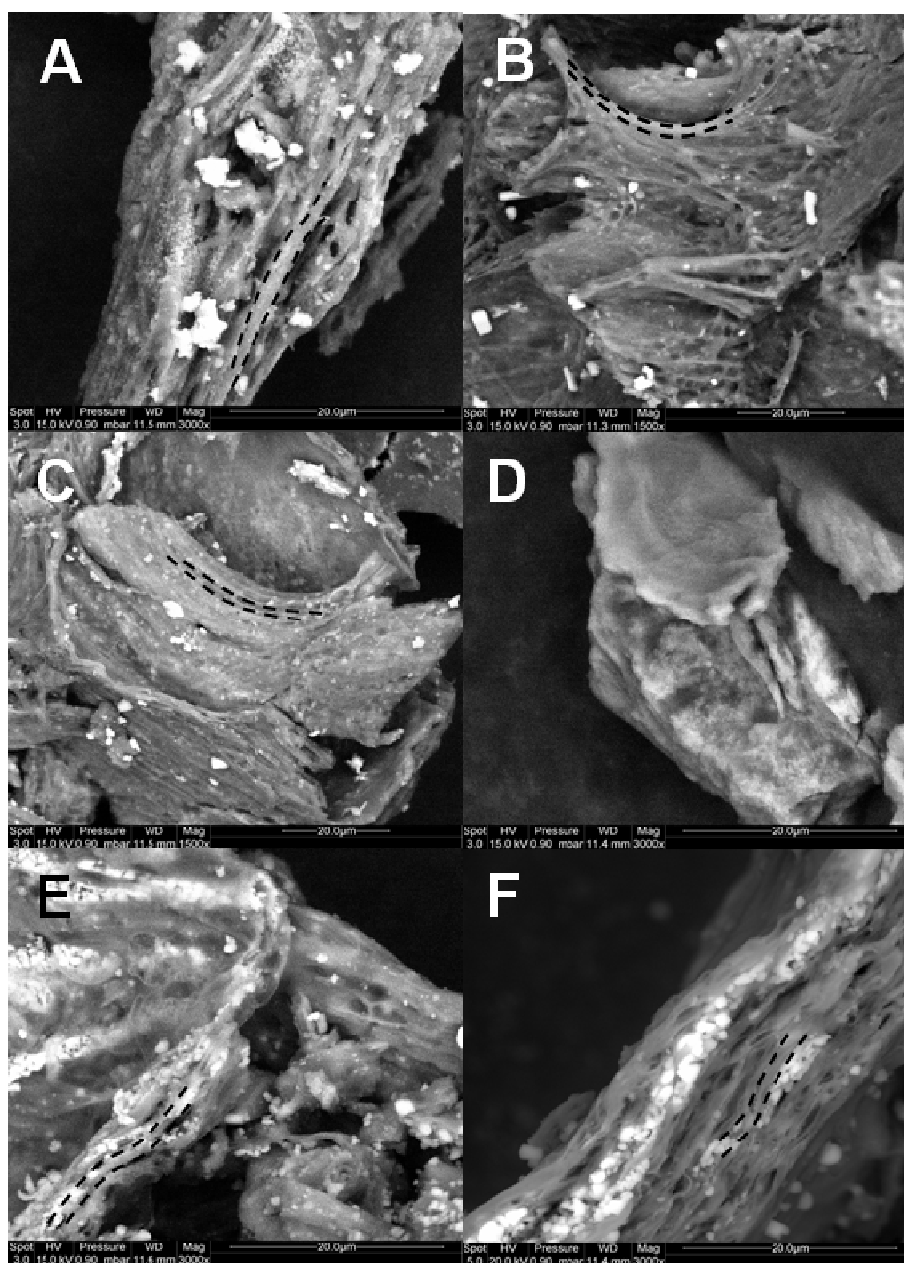


Figure 91 : Observations en microscopie électronique à balayage de *Cylindrotheca closterium* après lyophilisation (A), lyophilisation suivie d'une UAE (B), d'une macération à chaud (C), d'une macération à température ambiante (D), d'une MAE (E) et d'une VMAE (F). Le sel présent dans le milieu de culture apparaît sous forme de cristaux blancs. Les pointillés noirs indiquent les couches formées par l'accumulation des cellules de *Cylindrotheca closterium*

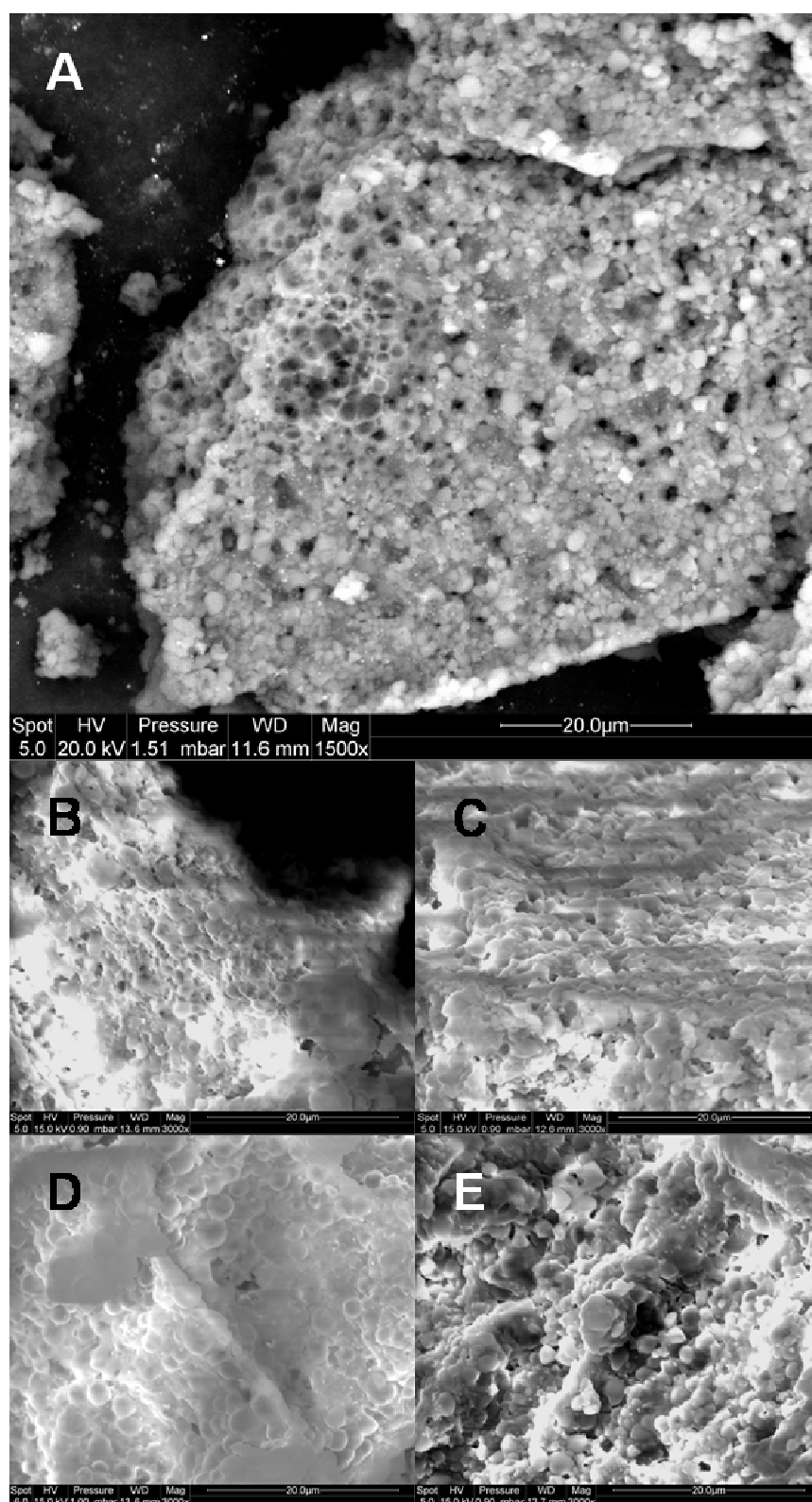
Dunaliella tertiolecta

Figure 92 : Observations en microscopie électronique à balayage de *Dunaliella tertiolecta* après lyophilisation (A), lyophilisation suivie d'une macération (B), d'une UAE (C), d'une MAE (D) et d'une VMAE (E)

Les observations réalisées en microscopie électronique à balayage de *C. closterium* après lyophilisation et après chaque procédé d'extraction sont présentées sur la figure 91.

Ces observations révèlent que les cellules se sont rassemblées et se sont déposées pendant la lyophilisation en couches superposées (figure 91A), qui sont représentées par des pointillés sur la figure. Le sel contenu dans le milieu de culture a précipité pendant la lyophilisation, il apparaît sur les photos sous forme de cristaux blancs.

Les traitements appliqués aux cellules lyophilisées n'ont pas d'effet sur la structure obtenue après lyophilisation sauf dans le cas de l'UAE (Figure 91B). Cette technique détruit la formation en couche.

Les observations réalisées en microscopie électronique à balayage de *D. tertioleca* après lyophilisation et après chaque procédé d'extraction sont présentées sur la figure 92. Ces observations montrent que les cellules se sont rassemblées et se sont déposées en couches pendant la lyophilisation (figure 92A), la forme de la cellule est conservée. L'application de différents procédés d'extraction ne modifie pas l'aspect des cellules. Quelques cellules fusionnent, ce phénomène est observable sur la figure 92E (VMAE).

3.2 RENDEMENT D'EXTRACTION DES PIGMENTS : DOSAGE PAR CLHP

3.2.1 Evaluation de l'efficacité des différentes méthodes sur la quantité de pigments extraits chez *Cylindrotheca closterium*

3.2.1.1 Méthode de dosage

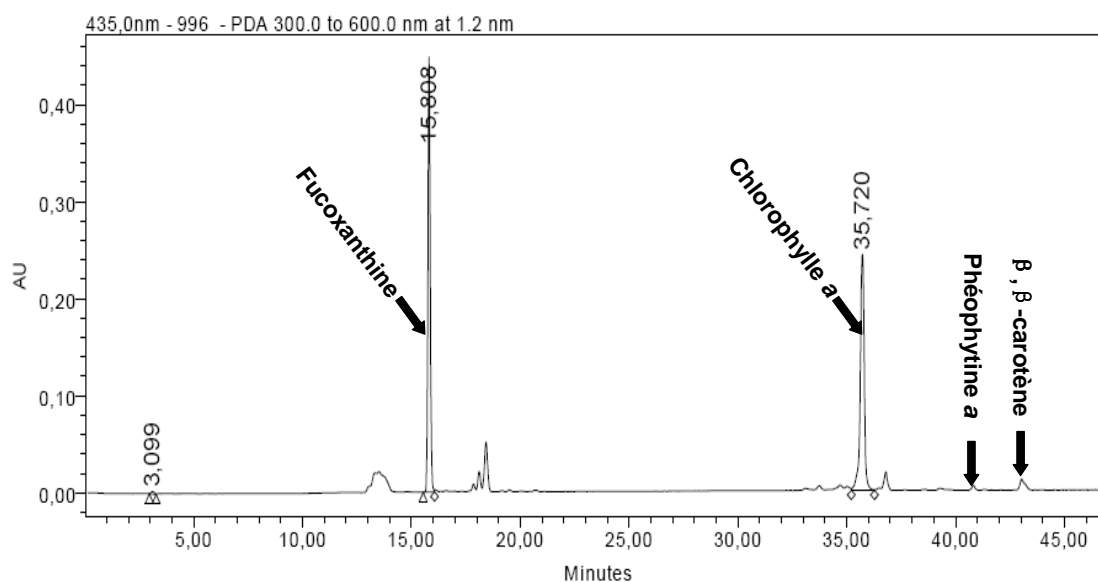


Figure 93 : Chromatogramme de l'extrait de *Cylindrotheca closterium* après macération à température ambiante, à 435 nm, en mode analytique

La figure 93 présente le chromatogramme à 435 nm obtenu pour *C. closterium* après une macération à température ambiante. La chlorophylle *a* et la fucoxanthine sont les deux pigments majoritaires. Le β, β -carotène et la phéophytine *a* sont également présents dans l'extrait, mais en quantité trop faible, pour pouvoir être dosés selon la méthode utilisée.

3.2.1.2 Macérations

La figure 94 présente les rendements d'extraction en fonction du temps pour les pigments majoritaires de *C. closterium* pour la macération à température ambiante (20°C) (Cf. figure 94A) et la macération à chaud (56°C) (Cf. figure 94B).

Pour la macération à température ambiante, le meilleur rendement d'extraction de la chlorophylle *a* est obtenu après 60 min de macération ($7,48 \pm 0,21 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) et après 120 min pour la fucoxanthine ($5,34 \pm 0,16 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$).

Pour la macération à chaud, le meilleur rendement d'extraction de la chlorophylle *a* ($9,31 \pm 0,44 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) est obtenu après 30 min de macération et après 60 min pour la fucoxanthine ($5,23 \pm 0,16 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$).

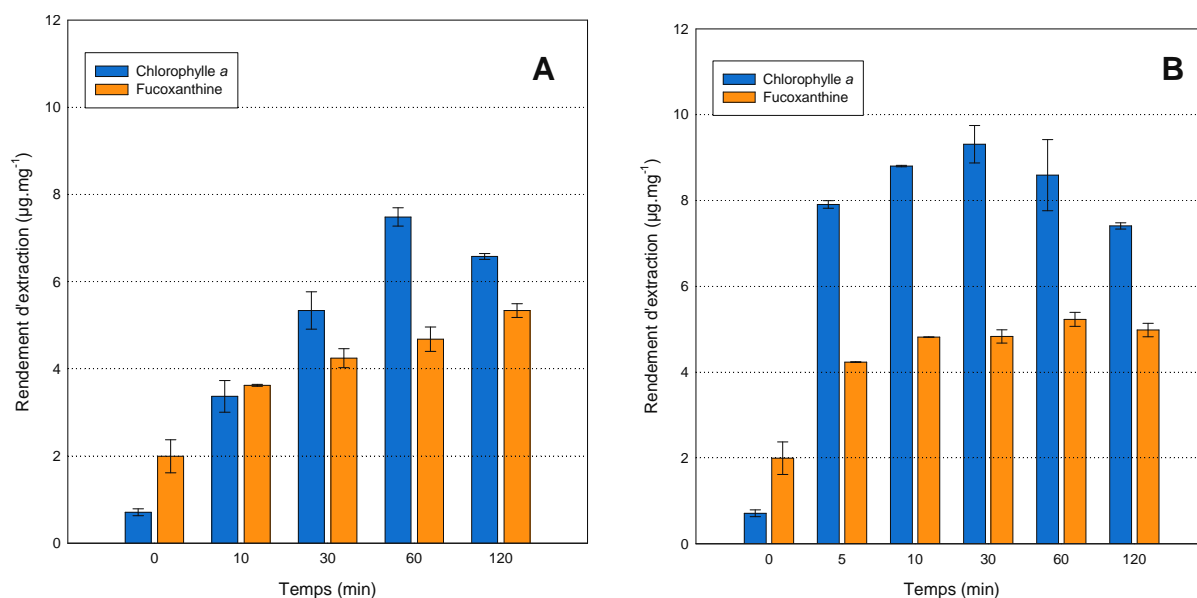


Figure 94 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Cylindrotheca closterium* en fonction du temps obtenus pour la macération à température ambiante (20°C) (A) et la macération à chaud (56°C) (B)

Extraction de la chlorophylle *a*

La macération à chaud permet une augmentation de 24% du rendement d'extraction de la chlorophylle *a* par rapport à la macération à température ambiante (pourcentage calculé sur les meilleurs valeurs obtenues pour chacune des méthodes).

La quantité de chlorophylle *a* extraite atteint un optimum après 60 et 30 minutes pour la macération et la macération à chaud, respectivement. La chlorophylle *a* est dégradée au-delà de ces durées d'extraction. La durée pour obtenir le meilleur rendement d'extraction de la chlorophylle *a* est moins importante en macération à chaud. Cette méthode est donc la plus efficace pour extraire ce pigment. Néanmoins, la chlorophylle *a* se dégrade plus rapidement dans un milieu à 56°C.

Extraction de la fucoxanthine

La quantité de fucoxanthine extraite atteint un optimum après 60 min d'extraction pour la macération à chaud. La fucoxanthine est dégradée au-delà de cette durée d'extraction. Pour la macération à température ambiante, la quantité de fucoxanthine augmente en fonction de la durée d'extraction. La fucoxanthine n'est donc pas totalement extraite après 120 minutes.

Les meilleurs rendements d'extraction pour la fucoxanthine sont du même ordre pour les deux méthodes de macération. La macération à chaud permet néanmoins d'obtenir autant de fucoxanthine mais de manière plus rapide.

La fucoxanthine est dégradée à partir de 60 minutes d'extraction à 56°C. Elle est thermolabile. Dans les mêmes conditions, la chlorophylle *a* se dégrade dès 30 minutes. La chlorophylle *a* apparaît comme une molécule plus sensible à une élévation de la température du milieu que la fucoxanthine.

Certains caroténoïdes sont connus pour être stables jusqu'à 60°C (Fратиanni *et al.*, 2010; Lee & Coates, 2003; Sun *et al.*, 2009). Cette caractéristique explique pourquoi la fucoxanthine subit dans une moindre mesure le phénomène de dégradation observé pour la chlorophylle *a*, lors de la macération à chaud.

3.2.1.3 UAE

La figure 95 présente les rendements d'extraction des pigments majoritaires de *C. closterium* obtenus par UAE en fonction du temps pour $P= 12,2$ W (Cf. figure 95A) et en fonction de la puissance pour $t= 5$ min (Cf. figure 95B).

Les meilleurs rendements d'extraction pour la chlorophylle *a* ($4,95 \pm 0,27\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) et la fucoxanthine ($4,49 \pm 0,27\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) sont obtenus après 10 min de sonication à une puissance de 12,2W. Pour cette méthode, il n'est pas possible d'établir de tendance quant à l'influence de la puissance et de la durée d'extraction.

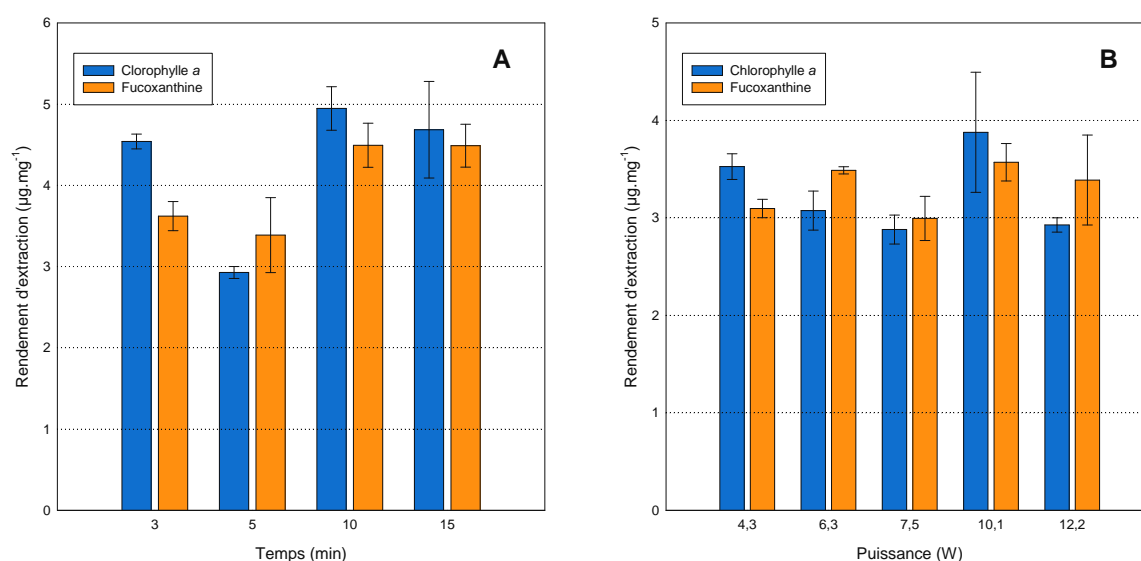


Figure 95 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Cylindrotheca closterium* obtenus pour l'UAE en fonction du temps, pour $P= 12,2$ W (A), et fonction de la puissance pour $t= 5$ min (B)

3.2.1.4 MAE

La figure 96 présente les rendements d'extraction des pigments majoritaires de *C. closterium* obtenus par MAE en fonction du temps pour $P= 50$ W (Cf. figure 96A) et en fonction de la puissance à $t= 5$ min (Cf. figure 96B).

Le meilleur rendement d'extraction pour la chlorophylle *a* ($8,65 \pm 0,29\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) est obtenu pour une puissance de 50W et un temps de 5 min. Pour la fucoxanthine le meilleur rendement d'extraction ($4,26 \pm 0,06\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) est obtenu après 15 min de traitement à 50W.

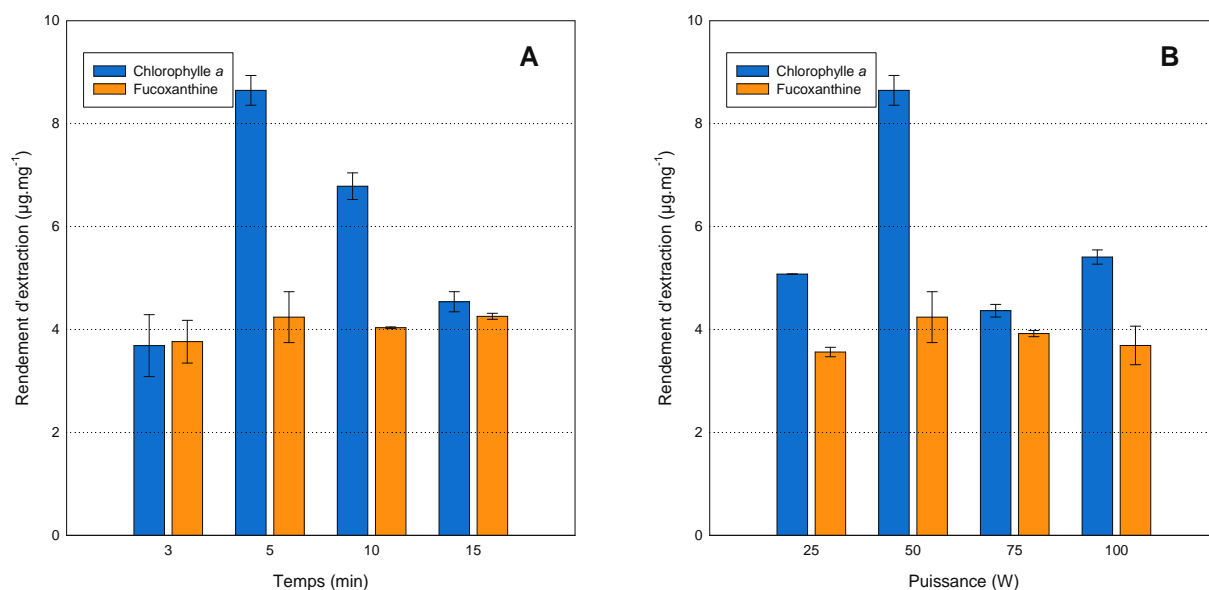


Figure 96 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Cylindrotheca closterium* obtenus, pour la MAE en fonction du temps pour P= 50 W (A) et fonction de la puissance pour t= 5min (B)

Extraction de la chlorophylle a

Le meilleur rendement d'extraction de la chlorophylle a ($8,65 \pm 0,29 \mu\text{g.mg}^{-1}$) est obtenu après 5 min d'extraction à 50W. Le plus faible ($3,68 \pm 0,60 \mu\text{g.mg}^{-1}$) est observé après 3 minutes à 50W. La différence observée représente une augmentation de 158% entre le rendement le plus faible et le plus élevé.

Sur la figure 96A (P = 50W), le rendement d'extraction de la chlorophylle a augmente en fonction de la durée d'extraction entre 0 et 5 min puis diminue entre 5 et 15 min. La chlorophylle a se dégrade à partir de 5 minutes d'extraction.

Sur la figure 96B (t = 5 min), le rendement d'extraction de la chlorophylle a augmente en fonction de la puissance entre 0 et 50W. La chlorophylle a se dégrade à partir 50W.

Extraction de la fucoxanthine

Le meilleur rendement d'extraction de la fucoxanthine ($4,26 \pm 0,06 \mu\text{g.mg}^{-1}$) est obtenu après 5 min d'extraction à 50W. Le plus faible ($3,10 \pm 0,08 \mu\text{g.mg}^{-1}$) est observé après 5 minutes à 25W. La différence observée représente une augmentation de de 36 % entre le rendement le plus faible et le plus élevé.

Sur la figure 96A (P = 50W), le rendement d'extraction de la fucoxanthine augmente en fonction de la durée d'extraction entre 0 et 5 min puis est stable entre 5 et 15 min.

Sur la figure 96B ($t = 5$ min), le rendement d'extraction de la fucoxanthine augmente en fonction de la puissance entre 0 et 50W puis diminue entre 50 et 100W. La fucoxanthine se dégrade à partir 50W.

La puissance et la durée d'extraction influencent la quantité de pigments extraites. Néanmoins, cette influence est plus importante pour le rendement d'extraction de chlorophylle *a*.

3.2.1.5 VMAE

La figure 97 présente les rendements d'extraction des pigments majoritaires de *C. closterium* obtenus pour la VMAE en fonction du temps pour $P = 50$ W (Cf. figure 97A) et en fonction de la puissance pour $t = 5$ min (Cf. Figure 97B).

Le meilleur rendement d'extraction pour la chlorophylle *a* ($5,25 \pm 0,04 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) est obtenu pour une puissance de 75W et un temps de 5 min. Pour la fucoxanthine, le meilleur rendement d'extraction ($3,68 \pm 0,13 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) est obtenu après 15 min de traitement à 50W.

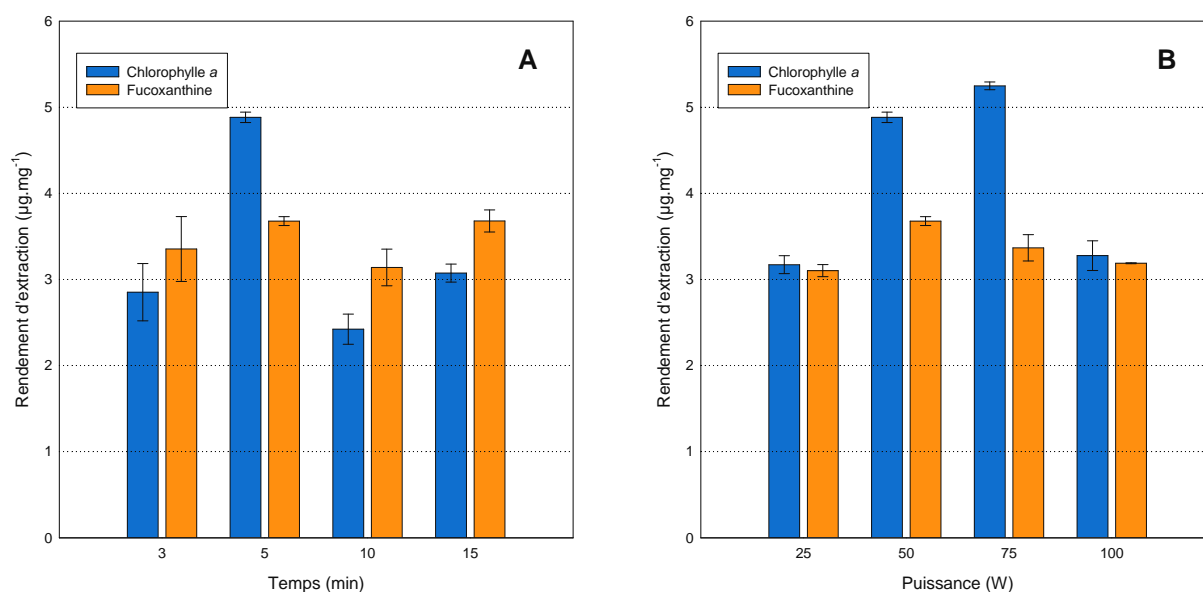


Figure 97 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Cylindrotheca closterium* obtenus pour la VMAE, en fonction du temps pour $P = 50$ W (A) et fonction de la puissance pour $t = 5$ min (B)

Extraction de la chlorophylle a

Le meilleur rendement d'extraction de la chlorophylle *a* ($5,25 \pm 0,04 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) est obtenu après 5 min d'extraction à 75W. Le plus faible ($2,42 \pm 0,18 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) est observé après 10 minutes à 50W. La différence observée représente une augmentation de 116% entre le rendement le plus faible et le plus élevé.

Sur la figure 97A ($P = 50\text{W}$), le rendement d'extraction de la chlorophylle *a* augmente en fonction de la durée d'extraction entre 0 et 5 min. La chlorophylle *a* se dégrade à partir de 5 minutes d'extraction.

Sur la figure 97B ($t = 5 \text{ min}$), le rendement d'extraction de la chlorophylle *a* augmente en fonction de la puissance entre 0 et 75W. La chlorophylle *a* se dégrade à partir 75W.

Extraction de la fucoxanthine

Le meilleur rendement d'extraction de la fucoxanthine ($3,68 \pm 0,13 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) est obtenu après 5 min d'extraction à 50W. Le plus faible ($3,14 \pm 0,21 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) est observé après 3 minutes à 25W. La différence observée représente une augmentation de 17% entre le rendement le plus faible et le plus élevé.

La figure 97A ne permet pas de relever une influence de la durée d'extraction sur la quantité de fucoxanthine extraite.

Sur la figure 97B ($t = 5 \text{ min}$), le rendement d'extraction de la fucoxanthine augmente en fonction de la puissance entre 0 et 50W. La fucoxanthine se dégrade à partir 50W.

L'ensemble de ces résultats indique que la puissance d'extraction a une influence sur la quantité de fucoxanthine extraite.

L'ensemble de ces résultats indique que la durée et la puissance d'extraction ont une influence importante sur la quantité de chlorophylle *a* extraite. Pour, le rendement d'extraction de la fucoxanthine seule la puissance d'irradiation micro-onde a une influence sur la quantité de pigment extraite.

3.2.1.6 Effet température

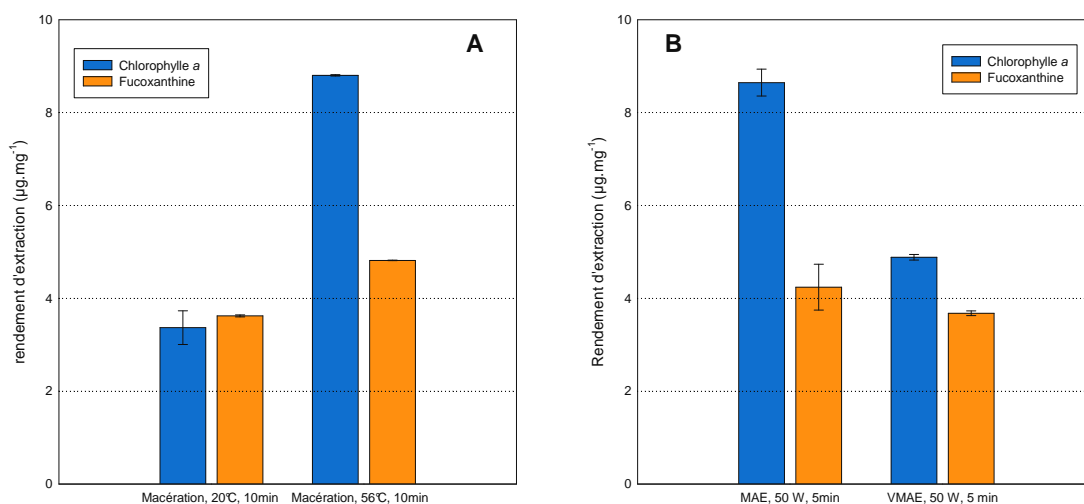


Figure 98 : Comparaison entre les rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Cylindrotheca closterium* obtenus pour la macération à température ambiante et la macération à chaud pendant 10 min (A). Et pour la MAE et la VMAE pour P= 50 W et t=5min(B)

La figure 98A permet de comparer les rendements d'extraction des pigments majoritaires de *C. closterium* obtenu par macération à température ambiante (20°C) et à chaud (56°C), pour 10 minutes d'extraction. Pour la chlorophylle *a* et la fucoxanthine les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus pour la macération à chaud. Cette figure indique qu'une augmentation de la température favorise significativement l'extraction des pigments.

La figure 98B permet de comparer les rendements d'extraction des pigments majoritaires de *C. closterium* entre la MAE et la VMAE, pour une puissance de 50W et un temps de 5 min. Excepté la pression, la principale différence entre la VMAE et la MAE est la température. La VMAE est réalisée à 22°C et la MAE à 56°C. Cette figure indique également qu'une augmentation de la température favorise l'extraction des pigments.

Quel que soit le processus utilisé une augmentation de la température du milieu favorise l'extraction des pigments. Cependant, la difficulté est de déterminer avec précision la température d'extraction permettant d'effectuer une extraction rapide de pigments avec des rendements élevés, sans toutefois entraîner la dénaturation des pigments thermolabiles tels que la chlorophylle *a*.

Pour la fucoxanthine, la température influence le rendement d'extraction. Cette influence est cependant plus faible en comparaison des résultats observés pour la chlorophylle *a*. Les caroténoïdes sont retrouvés dans le cytoplasme des microalgues marines, alors que les pigments chlorophylliens sont strictement liés aux chloroplastes des microalgues (Jeffrey *et al.*, 1997). Les pigments caroténoïdes sont plus accessibles que les pigments chlorophylliens. Cette information peut en partie expliquer cette différence.

3.2.1.7 Comparaison des différentes méthodes d'extraction

La figure 99 présente pour chacune des méthodes les paramètres qui ont permis d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction pour la chlorophylle *a* (Cf. figure 99A) et la fucoxanthine (Cf. figure 99B). Le tableau 31 présente les valeurs numériques correspondant à la figure 99.

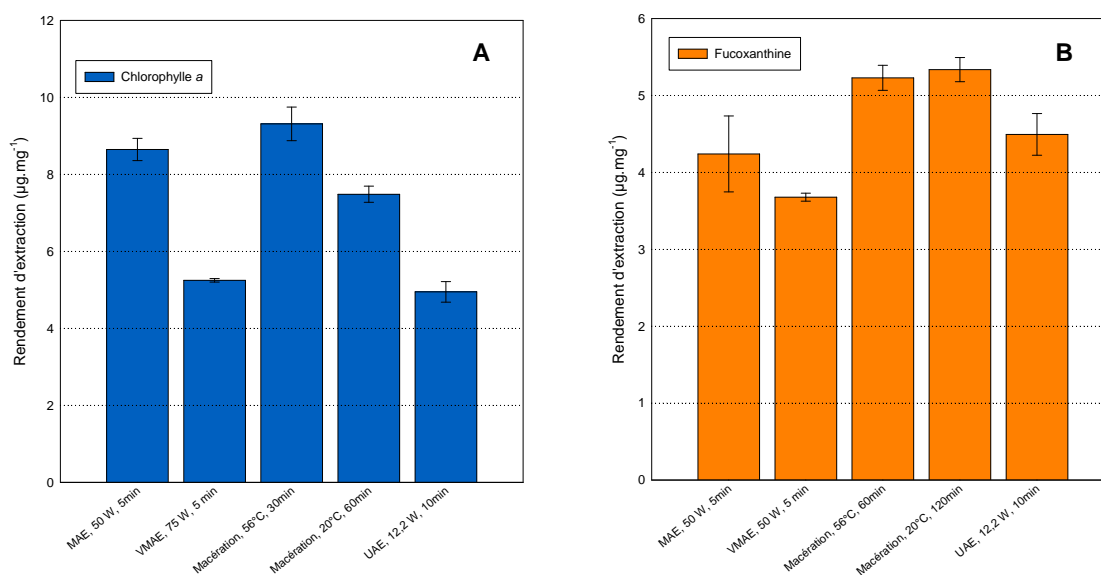


Figure 99 : Présentation des meilleurs rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Cylindrotheca closterium* obtenus pour chacune des méthodes d'extraction pour les paramètres permettant d'obtenir les meilleurs rendements

Tableau 31 : Tableau récapitulatif des meilleurs rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Cylindrotheca closterium* obtenus pour chacune des méthodes d'extraction et les paramètres permettant d'obtenir les meilleurs rendements

Méthodes	Macération	Macération à chaud	MAE	VMAE	UAE
chlorophylle a					
Paramètres	60 min 20°C	30 min 56°C	5min 56°C 50 W	5min 22°C 75 W	10min 8,5°C 12,2 W
Rendement d'extraction en $\mu\text{g.mg}^{-1}$	7,48 ± 0,21	9,31 ± 0,44	8,65 ± 0,29	5,25 ± 0,04	4,95 ± 0,27
fucoxanthine					
Paramètres	120 min 20°C	60 min 56°C	5min 56°C 50 W	5min 22°C 50 W	10min 8,5°C 12,2 W
Rendement d'extraction en $\mu\text{g.mg}^{-1}$	5,34 ± 0,16	5,23 ± 0,16	4,24 ± 0,49	3,68 ± 0,05	4,49 ± 0,27

Extraction de la chlorophylle a

Pour la chlorophylle *a*, la meilleure méthode d'extraction est la macération à chaud (56°C) après 30 minutes d'extraction ($9,31 \pm 0,44 \mu\text{g.mg}^{-1}$), la MAE présente un rendement d'extraction de $8,65 \pm 0,29 \mu\text{g.mg}^{-1}$ après 5 min de traitement à 50W.

Les autres méthodes d'extraction présentent des rendements d'extraction de la chlorophylle *a* inférieurs à $8 \mu\text{g.mg}^{-1}$.

L'UAE et la VMAE sont les méthodes les moins efficaces pour extraire la chlorophylle *a*. La température est un paramètre qui influence l'extraction des pigments. La température fixée à 22°C en VMAE explique ce résultat.

Concernant l'UAE, les faibles rendements d'extraction obtenus peuvent s'expliquer par :

- la température d'extraction (8,5°C),
- les points chauds générés dans le milieu par les ultrasons pouvant causer une dégradation des pigments,
- les puissances utilisées qui ne dépassent pas 12,2W.

Pour la MAE, la figure 96B indique que pour un même temps d'extraction, la quantité de pigments extraite évolue en fonction de la puissance (température fixée à 56°C), jusqu' à la dénaturation des pigments. Ce résultat est également observé pour la VMAE (Cf. figure 97B). La puissance de l'irradiation micro-onde est donc également un paramètre qui a une influence sur le rendement d'extraction de la chlorophylle *a*.

La MAE permet donc d'obtenir des rendements d'extraction similaires à la macération à chaud mais de manière plus rapide en raison de l'influence de l'irradiation micro-onde.

Extraction de la fucoxanthine

Le rendement d'extraction maximal est obtenu par macération à 20°C pendant 120 minutes ($5,34 \pm 0,16 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$). Des rendements d'extractions équivalents sont obtenus par macération à chaud après 60 minutes d'extraction. La figure 99B indique que la MAE, la VMAE ainsi que l'UAE n'améliorent pas l'extraction de la fucoxanthine.

3.2.1.8 Conclusion

L'ensemble de l'étude menée chez *C.closterium* montre que :

- La macération est la meilleure méthode pour extraire la fucoxanthine
- la MAE et la macération à chaud sont les meilleures méthodes pour extraire la chlorophylle *a*.
- Un apport de chaleur au milieu favorise l'extraction des pigments
- Le rendement d'extraction des pigments augmente en fonction de la puissance de l'irradiation micro-onde. Cette constatation explique pourquoi la MAE permet d'extraire autant de chlorophylle *a* que la macération à chaud mais de manière plus rapide.

3.2.2 Evaluation de l'efficacité des différentes méthodes sur la quantité de pigments extraits chez *Dunaliella tertiolecta*

3.2.2.1 Méthode de dosage des pigments

La figure 100 présente le chromatogramme à 435 nm obtenu pour *D. tertiolecta* après une macération à température ambiante. Le β,β -carotène, la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b* sont les trois pigments majoritaires. Les pics présents entre 17 et 23 minutes correspondent aux pigments minoritaires (néoxanthine, violaxanthine et lutéine) retrouvés chez *D. tertiolecta*.

Le β,β - carotène, la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* sont dosés dans les extraits pour évaluer l'efficacité des différentes méthodes d'extraction.

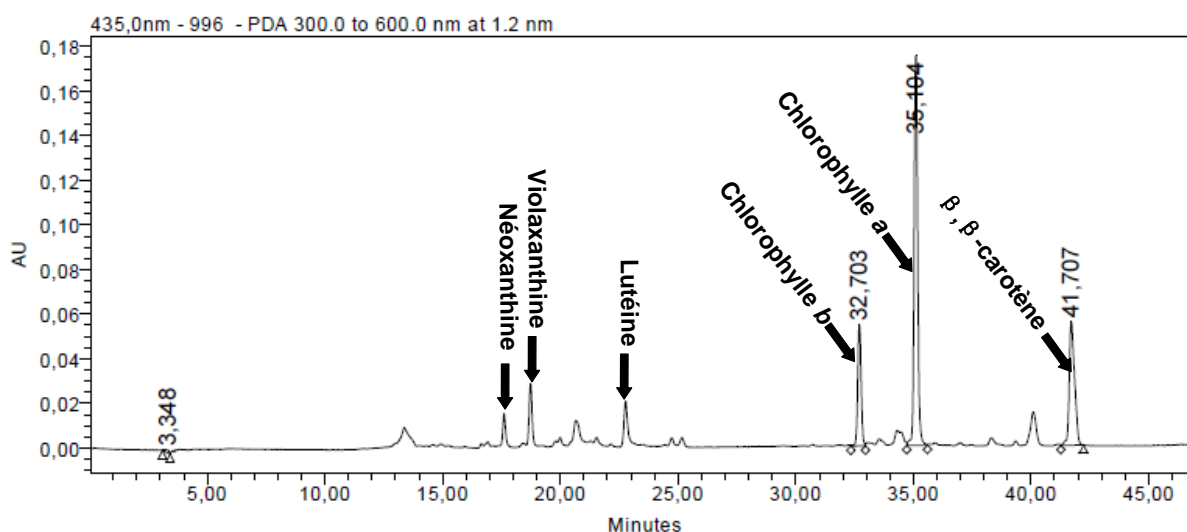


Figure 100 : Chromatogramme de l'extrait de *Dunaliella tertiolecta* après macération à température ambiante, à 435 nm, en mode analytique

3.2.2.2 Macération à température ambiante (20°C)

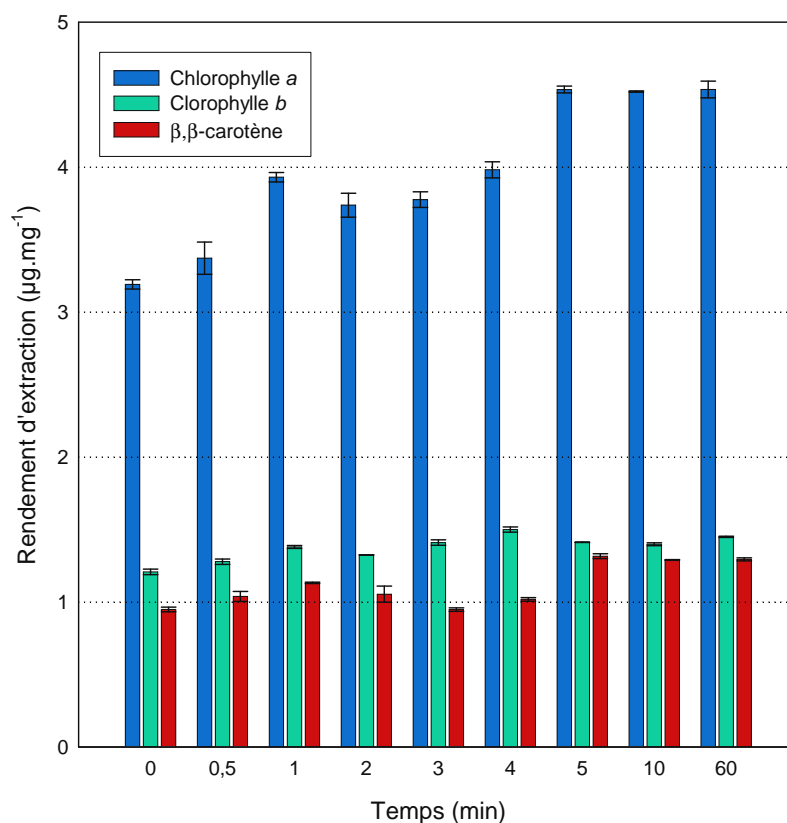


Figure 101 : Rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Dunaliella tertiolecta* en fonction du temps obtenus pour la macération à température ambiante (20°C)

La figure 101 présente les rendements d'extraction des pigments majoritaires de *D. tertiolecta* obtenus pour différentes durée d'extraction par macération à température ambiante.

La macération à température ambiante permet une extraction quasiment instantanée de la chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et du β,β-carotène.

Pour la chlorophylle *b*, $1,21 \pm 0,02 \mu\text{g.mg}^{-1}$ sont extraits à $t=0$ min, contre $1,50 \pm 0,01 \mu\text{g.mg}^{-1}$ après 4 minutes d'extraction.

Pour le β,β-carotène, dès 1 minute d'extraction le rendement est de $1,13 \pm 0,01 \mu\text{g.mg}^{-1}$. Le rendement d'extraction maximal ($1,32 \pm 0,02 \mu\text{g.mg}^{-1}$) est obtenu après 5 minutes d'extraction.

Pour la chlorophylle *a*, le rendement maximal d'extraction ($4,53 \pm 0,02 \mu\text{g.mg}^{-1}$) est obtenu après 5 minutes de macération.

3.2.2.3 Comparaison entre les différentes méthodes d'extraction

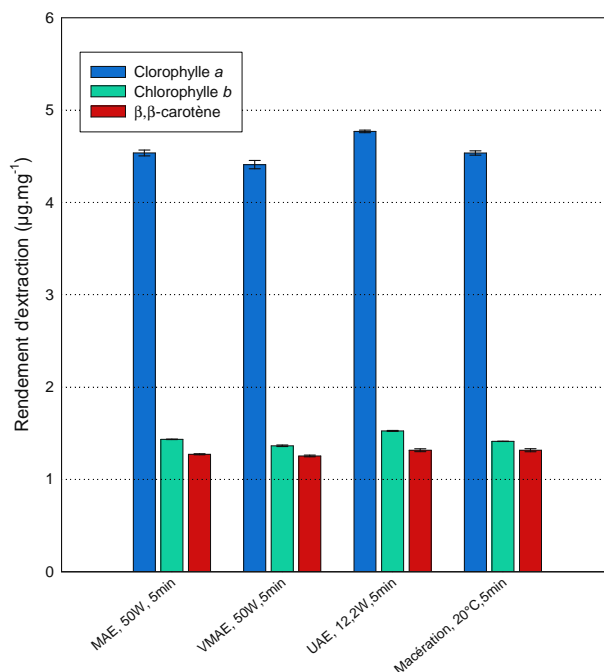


Figure 102 : Comparaison des rendements d'extraction des pigments majoritaires de *Dunaliella tertiolecta* obtenus en MAE (50W, 5min), VMAE (50W, 5min), UAE (12,2W, 5min) et Macération (20°C, 5min)

La figure 102 présente les rendements d'extraction des pigments majoritaires de *D. tertiolecta* obtenus pour chacune des méthodes d'extraction (Macération : 5 min, MAE : 5 min, 50W, VMAE 5 min, 50W, UAE : 5 min, 12,2 W), selon des paramètres fixés. Le tableau 32 présente les valeurs numériques associées à cette figure. La figure 102 montre que les rendements d'extraction sont équivalents quelle que soit la méthode d'extraction utilisée.

Tableau 32 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec *Dunaliella tertiolecta*

Méthodes	Macération	MAE	VMAE	UAE
Paramètres	5 min 20°C	5 min 56°C 50 W	5 min 22°C 50 W	5 min 8,5°C 12,2 W
chlorophylle a				
Rendement d'extraction en µg.mg ⁻¹	4,53 ± 0,02	4,53 ± 0,03	4,41 ± 0,05	4,77 ± 0,01
chlorophylle b				
Quantité extraite en µg.mg ⁻¹	1,41 ± 0,01	1,43 ± 0,01	1,36 ± 0,01	1,52 ± 0,01
β,β-carotène				
Rendement d'extraction en µg.mg ⁻¹	1,32 ± 0,02	1,27 ± 0,01	1,25 ± 0,01	1,32 ± 0,02

Pour chacune des méthodes d'extraction, le marc obtenu était toujours de couleur blanche. Les figures 75 et 76 indiquent que toutes les différentes méthodes d'extraction donnent des rendements d'extraction équivalents. Ces résultats et observations indiquent que la macération à température ambiante est une méthode suffisante pour extraire les pigments de *D. tertiolecta*.

3.2.2.4 Conclusion

L'ensemble de l'étude réalisée sur *D. tertiolecta* montre que toutes les méthodes d'extraction permettent d'obtenir des quantités de pigments équivalentes. Pour cette microalgue la macération est la méthode à privilégier pour sa simplicité. Elle ne nécessite pas d'appareillage coûteux ni d'apport d'énergie au mileu.

3.2.3 Effet de la composition de la paroi des microalgues sur l'extraction des pigments

L'étude menée sur *C. closterium* montre que les rendements d'extraction ne sont pas les mêmes selon la méthode d'extraction utilisée. Une augmentation de la température et de la puissance de l'irradiation micro-onde permettent d'améliorer le rendement d'extraction de la chlorophylle *a*.

A l'inverse, chez *D. tertiolecta* les rendements d'extraction sont les mêmes pour toutes les méthodes utilisées. De plus, l'extraction des différents pigments est quasiment instantanée.

Les microalgues possèdent souvent une structure périphérique qui peut être située sur ou sous la membrane plasmique, ou les deux.

Cylindrotheca closterium est une diatomée. Ce groupe de microalgue se caractérise par la présence d'une frustule, constituée de silice entourant la cellule. *Dunaliella tertiolecta* appartient à la classe des Chlorophyceae. Les espèces appartenant au genre *Dunaliella* sont dépourvues de frustule, elles sont couvertes de cellulose, de xylanes, de mannanes et/ou de glycoprotéine (Jeffrey *et al.*, 1997).

Notre étude montre que l'extraction des pigments est plus difficile lorsque la microalgue étudiée possède une frustule. L'utilisation de procédés d'extraction spécifique est alors nécessaire.

3.2.4 Apport de la MAE et de la VMAE

Chez *C. clostérium*, le rendement d'extraction des pigments augmente en fonction de la température du milieu. Il augmente également en fonction de la puissance de l'irradiation micro-onde, en MAE et VMAE. En MAE, l'association de ces deux paramètres permet d'extraire autant de pigments qu'en macération à chaud mais plus rapidement.

Lee et al (2010) ont étudié l'efficacité de différentes méthodes pour extraire les lipides totaux de *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, et de *Scenedesmus* sp. Ils ont montré que la MAE était la méthode la plus efficace. Wang et al (2008) et Xiao et al (2009) ont montré que la VMAE était la méthode la plus intéressante pour extraire les composés thermosensibles et sensibles à l'oxygène, issus d'herbes originaires de chine. Cette méthode permet de préserver ces molécules en raison de la faible température du milieu et de l'absence d'oxygène. Enfin Cravotto et al (2008) ont montré que la MAE permet d'accroître le rendement d'extraction de l'acide docosahéxaénoïque issue de microalgues marines.

Notre étude ainsi que l'ensemble des travaux présentés précédemment montre que la technologie micro-onde permet un gain de temps. De plus, l'utilisation de la VMAE permet de préserver les molécules sensibles. La MAE et la VMAE sont d'autant plus avantageuses qu'elles permettent un contrôle strict des paramètres tels que la puissance et la température. Elles sont donc plus reproductibles.

4 POURSUITE DE L'ETUDE ET PERSPECTIVES

4.1 DEVELOPPEMENT DE PROCEDES D'EXTRACTION DE PIGMENTS DE MICROALGUES MARINES

4.1.1 Approche méthodologique - Utilisation des « plans d'expérience »

Pour *C. closterium*, la MAE et la macération à chaud sont les méthodes les plus efficaces pour extraire les pigments.

L'étude a montré que des paramètres tels que la durée d'extraction, la température du milieu ou bien la puissance à laquelle était utilisée les appareils, permettaient d'obtenir des variations dans les rendements d'extraction. Mais, l'étude ne fournit pas de modèle permettant d'établir la contribution de chacun des paramètres.

Pour pouvoir obtenir un tel modèle, une approche pourrait consister à mettre en place la méthodologie des « plans d'expérience ». Cette méthode, en plus de pouvoir fournir un modèle englobant plusieurs paramètres, en réalisant un minimum d'expérimentations, permet également de savoir si les différents paramètres de l'étude interagissent entre eux. Ce type d'étude peut être mené sur d'autres catégories de solvants et sur d'autres espèces de microalgues, en y incluant le paramètre ratio biomasse/solvant.

4.1.2 Ratio biomasse/solvant

Le ratio biomasse solvant utilisé dans l'étude est de 1 mg de biomasse lyophilisée pour 0,6 ml de solvant (50 mg pour 30ml).

Dans un souci environnemental et économique, il conviendrait de réaliser des études visant à déterminer le ratio biomasse/solvant à partir duquel, la quantité de solvant devient limitante pour l'extraction des pigments.

4.1.3 Solvant d'extraction

Toutes les extractions de cette étude ont été réalisées dans l'acétone. Il permet de solubiliser la plupart des pigments photosynthétiques et d'inhiber l'activité des chlorophyllases. Un autre avantage de l'acétone est que son point d'ébullition sous pression atmosphérique est de 56°C. Pour les procédés nécessitant le chauffage du milieu, cette température modérée permet de préserver les pigments d'une dénaturation thermique rapide.

L'acétone, si elle permet la solubilisation de la plupart des pigments (sauf les biliprotéines), n'est pas sélectif quant au type de pigments extraits (xanthophylles, chlorophylles, carotènes).

Dans le but d'augmenter la sélectivité du procédé d'extraction pour un type de pigment donné, les extractions peuvent être réalisées dans des solvants permettant une meilleure solubilisation des pigments apolaires (chlorophylles ou carotènes) ou à l'inverse des pigments polaires (xanthophylles ou biliprotéines). Dans la même optique, l'utilisation de mélanges de solvants peut être envisagée.

4.1.4 Espèces de microalgues marines étudiées

Cette étude se limite à deux espèces de microalgues marines modèles. Au terme de cette étude, il apparaît qu'à un type de microalgues correspond une méthode d'extraction. Pour les espèces d'intérêt, en nutraceutique ou industrie alimentaire, il serait intéressant de définir la méthode donnant le meilleur résultat pour une molécule particulière. De même, il peut être intéressant d'utiliser des procédés d'extraction utilisant les micro-ondes, notamment pour certains rhodophytes du genre *porphyridium* ou certaines espèces de dinoflagellés pour lesquelles l'extraction de pigments est difficile (Jeffrey *et al.*, 1997).

4.1.5 Elargissement du champ d'investigation à tous les types de pigments

La méthodologie développée ici n'est pas valable pour les biliprotéines. Ces pigments sont solubles en milieu aqueux. Notre travail de développement méthodologique peut être applicable à l'extraction des biliprotéines des microalgues. En effet, la sous-unité recombinante β de C-phycoyanine a montré des activités antiprolifératives et apoptotiques sur quatre lignées cellulaires cancéreuses (Wang & Weller, 2006).

4.1.6 Elargissement du champ d'investigation à d'autres molécules

Cette étude s'est intéressée au rendement d'extraction de pigments de microalgues. Les microalgues marines sont connues pour contenir des acides gras, des stérols, des composés phénoliques, des terpènes, des enzymes ou des polysaccharides (Kornprobst, 2005). Les différentes méthodes d'extraction étudiées pourraient également s'appliquer à ces composés.

SECTION 4 : CONCLUSION SUR LES DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES

Cette étude a permis de mettre en avant l'importance de l'analyse et de l'extraction pour la purification et la caractérisation des pigments d'origine microalgale.

La standardisation des méthodes d'analyse et de purification a montré que :

- Les méthodes d'analyse développées en CLHP sont efficaces et permettent l'étude des extraits contenant des pigments issus de différentes espèces de microalgues marines.
- Dans le cas où la CLHP est la méthode choisie, la standardisation des méthodes d'analyse est un point essentiel en vue de la purification d'un pigment.

Le développement des procédés d'extraction a permis de montrer que :

- Chez *Dunaliella tertiolecta* : la macération est le procédé d'extraction à privilégier pour les pigments des espèces de microalgues ayant des enveloppes externes comparables à celle de *D. tertiolecta*.
- Chez *Cylindrotheca closterium* :
 - o La méthode d'extraction utilisée influence le rendement d'extraction des pigments. La présence d'une frustule ne facilite pas l'extraction des pigments. Le recours à des techniques d'extraction spécifiques est nécessaire.
 - o Un apport de chaleur au milieu favorise l'extraction des pigments.
 - o l'utilisation de la MAE et de la macération à chaud sont les méthodes les plus efficaces pour extraire les pigments.
 - o La MAE est le meilleur procédé d'extraction de pigments chlorophylliens, en termes d'efficacité alliée à la vitesse d'extraction.
 - o Il reste à définir pour chaque méthode les paramètres permettant le meilleur rendement d'extraction des pigments, pour une espèce microalgale donnée. Ceci peut être réalisé en utilisant les « Plans d'expérience ».
 - o La technologie micro-onde est un procédé d'intérêt pour extraire les pigments de microalgues marines frustulées. Elle pourrait être utilisée sur des espèces où l'extraction des pigments est difficile.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Actuellement, dans le traitement des cancers, les efforts de recherche se tournent vers les thérapies ciblées. L'objectif de ces thérapies est d'agir plus spécifiquement sur les cellules cancéreuses afin de limiter la toxicité des médicaments et de palier les phénomènes de résistance apparaissant lors des traitements en chimiothérapie.

Les cibles de ces nouvelles thérapies sont :

- les voies de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules.
- Le cycle cellulaire qui contrôle la division des cellules.
- Les phénomènes qui contrôlent l'angiogenèse.
- La restauration du phénomène d'apoptose.

Les microalgues marines, organismes unicellulaires, déjà utilisées dans des secteurs tels que la nutraceutique, la cosmétique ou l'agroalimentaire sont une source présentant un fort potentiel pour mettre en évidence de nouvelles molécules anticancéreuses, car :

- les algues marines sont représentées par quatre lignées (bleu, rouge, verte et brune), alors que les végétaux terrestres ne sont représentés que par la lignée verte et les cyanobactéries.
- les cyanobactéries et les dinoflagellés ont déjà montré un fort potentiel pour la mise en évidence de molécules à activités biologiques,
- les microalgues marines sont cultivables en photobioréacteur,
- les microalgues marines présentent une grande biodiversité.

Le but du travail de recherche présenté dans ce mémoire était de mettre à profit le potentiel des microalgues marines en cancérologie.

Dans la première partie de cette thèse, l'objectif était de mettre en évidence des molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. Le travail s'est articulé en trois parties :

- i. Le potentiel antiprolifératif de différents extraits de quatre espèces de microalgues marines a été évalué sur quatre lignées cellulaires cancéreuses. Les espèces choisies n'étaient ni des dinoflagellés, ni des cyanobactéries et ne devaient pas contenir de fucoxanthine pour ne pas être redondant avec de précédents travaux. Ce travail a conduit à la sélection de l'extrait dichlorométhanique de *D. tertiolecta*.
- ii. La seconde étape a consisté à isoler le principe actif présent dans cet extrait, en adoptant une démarche bioguidée. Le potentiel antiprolifératif des différentes fractions a été évalué sur la lignée cellulaire MCF-7 de cancer du sein. La violaxanthine a été identifiée comme l'une des molécules portant l'activité antiproliférative.
- iii. Le potentiel antiprolifératif, cytostatique, cytotoxique et pro-apoptotique de la violaxanthine a été étudié. A ce jour, il ressort que la violaxanthine présente sur la lignée cellulaire MCF-7 une activité cytotoxique, cytostatique réversible et pro-nécrotique et pro-apoptotique.

La violaxanthine est un caroténoïde de la classe des xanthophylles. Les caroténoïdes sont connus pour présenter des propriétés antioxydantes prévenant l'apparition de cancer *via* l'alimentation. De plus, la fucoxanthine, la néoxanthine ou encore le β,β -carotène montrent des activités anti-prolifératives et pro-apoptotiques sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. Enfin, les microalgues marines contiennent de nombreux caroténoïdes qui ne sont pas retrouvés chez les végétaux terrestres, comme la diatoxanthine, la diadinoxanthine ou le diadinochrome.

Ces informations ainsi que nos résultats permettent d'envisager plusieurs perspectives de recherche.

- i. Le potentiel pro-apoptotique de la violaxanthine doit être clairement établi pour la lignée MCF-7.
- ii. Les cibles moléculaires de la violaxanthine pour la lignée MCF-7 doivent être définies.
- iii. Les potentiels antiprolifératif, cytotoxique, cytostatique et pro-apoptotique de la violaxanthine doivent être étudiés sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses.
- iv. Les autres caroténoïdes microalgaux doivent faire l'objet d'investigation pour leur potentiel anticancéreux.
- v. Les cibles moléculaires des caroténoïdes sur les lignées cancéreuses en général doivent être établies.

Les pigments caroténoïdes sont des molécules connues et disponibles commercialement. Cependant, les formats proposés (en milieu liquide, faible concentration, petit volume) ne correspondent pas aux contraintes des études pharmacologiques. L'étude du potentiel anticancéreux des pigments caroténoïdes nécessite une étape de purification à partir de la source biologique. L'obtention de molécules d'intérêt en quantité suffisante nécessite donc des méthodes de purification et d'extraction efficaces.

La seconde partie de cette thèse a donc été consacrée au développement de méthodologies efficaces en vue de la purification des pigments issus de microalgues marines. Ce travail a permis :

- i. Le développement de méthodes d'analyse et de purification efficaces de pigments issues de microalgues marines par CLHP.
- ii. Le développement de procédés d'extraction de pigments de microalgues marines. A ce jour, il ressort que les pigments issus de microalgues marines possédant une frustule comme les diatomées sont extraits de manière plus efficace par des procédés d'extraction nécessitant un chauffage du milieu.
- iii. L'utilisation de la technologie micro-onde consitue un réel apport pour l'extraction des composés bioactifs issus de sources végétales et notamment de microalgues marines.
- iv. La technologie micro-onde présente toutes les qualités requises pour s'inscrire dans le domaine de la recherche de molécules naturelles à activité biologique.

Pour l'industrie pharmaceutique, les produits d'origine naturelle restent une source inépuisable de nouveaux médicaments. Cet intérêt pour le milieu naturel est illustré par les efforts de développements considérables réalisés pour les méthodes d'isolement de principes actifs. L'apparition du criblage à haut débit, l'amélioration des méthodes de purifications ainsi que le développement des méthodes de caractérisation en sont l'exemple.

Le travail présenté dans cette thèse s'est inscrit dans cette démarche de valorisation des produits naturels marins pour la mise en évidence de nouvelles molécules anticancéreuses et a permis spécifiquement :

- i. De démontrer le potentiel anticancéreux de la violaxanthine.
- ii. De mettre en place des méthodes d'extraction, d'analyse et de purification de pigments issus de microalgues marines.

Enfin, il a permis plus largement de :

- i. De confirmer le potentiel des microalgues marines comme source de molécules anticancéreuses.
- ii. De démontrer l'intérêt de la technologie micro-onde pour l'extraction de molécules à activités biologiques issues de produits naturels.

RÉFÉRENCES

- Abramson, L., Wirick, S., Lee, C., Jacobsen, C. & Brandes, J.A.** (2009) The use of soft X-ray spectromicroscopy to investigate the distribution and composition of organic matter in a diatom frustule and a biomimetic analog. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **56**(18), 1369-1380.
- Aminot, A. & Kérouel, R.** (2004) *Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses*. Ifremer.
- Andrianasolo, E.H., Haramaty, L., Vardi, A., White, E., Lutz, R. & Falkowski, P.** (2008) Apoptosis-Inducing Galactolipids from a Cultured Marine Diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Natural Products* **71**(7), 1197-1201.
- Antia, N.J. & Cheng, J.Y.** (1982) The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal* **17**, 39-50.
- Athukorala, Y., Kim, K.-N. & Jeon, Y.-J.** (2006) Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food and Chemical Toxicology* **44**(7), 1065-1074.
- Badros, A.Z., Goloubeva, O., Rapoport, A.P., Ratterree, B., Gahres, N., Meisenberg, B., Takebe, N., Heyman, M., Zwiebel, J., Streicher, H., Gocke, C.D., Tomic, D., Flaws, J.A., Zhang, B. & Fenton, R.G.** (2005) Phase II Study of G3139, a Bcl-2 Antisense Oligonucleotide, in Combination With Dexamethasone and Thalidomide in Relapsed Multiple Myeloma Patients. *Journal of Clinical Oncology* **23**(18), 4089-4099.
- Bai, R., Roach, M.C., Jayaram, S.K., Barkoczy, J., Pettit, G.R., Luduena, R.F. & Hamel, E.** (1993) Differential effects of active isomers, segments, and analogs of dolastatin 10 on ligand interactions with tubulin: Correlation with cytotoxicity. *Biochemical Pharmacology* **45**(7), 1503-1515.
- Bailly, C.** (2009) Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology* **77**(9), 1447-1457.
- Banerjee, S., Wang, Z., Mohammad, M., Sarkar, F.H. & Mohammad, R.M.** (2008) Efficacy of Selected Natural Products as Therapeutic Agents against Cancer. *Journal of Natural Products* **71**(3), 492-496.
- Bao, Q. & Shi, Y.** (2006) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **14**(1), 56-65.
- Barrett, J. & Jeffrey, S.W.** (1964) Chlorophyllase and formation of an atypical chlorophyllide in marine algae. *Plant Physiol* **33**, 911-917.
- Barrett, J. & Jeffrey, S.W.** (1971) A note on the occurrence of chlorophyllase in marine algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **7**(3), 255-262.

- Beppu, F., Niwano, Y., Sato, E., Kohno, M., Tsukui, T., Hosokawa, M. & Miyashita, K.** (2009) In vitro and in vivo evaluation of mutagenicity of fucoxanthin (FX) and its metabolite fucoxanthinol (FXOH). *Journal of Toxicological Sciences* **34**(6), 693-698.
- Bernades-Genisson, V., Bernadou, J., Berque-Bestel, I., Brion, J.D., Couquelet, J., Cussac, M., Debaert, M., Duval, O., Giorgi-Renault, S., Huet, J., Lacroix, R., Laronze, J., Laronze, J.Y., Le Baut, G., Loiseau, P., Nuhrich, A., Plat, M., Poisson, J., Robert-Piessard, S., Tournaire-Arellano, C., Uriac, P. & Varache-Lembege, M.** (Eds.) (2003) *Traité de chimie thérapeutique - Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers* Lavoisier.
- Bhakuni, D.S. & Rawat, D.S.** (2005) *Bioactive Marine Natural Product*. Springer.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. & Prinsep, M.R.** (2008) Marine natural products. *Natural Product Reports* **25**(1), 35-94.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.-E., Edris, W.A., Sutherland, D.P., Green, D.R. & Salvesen, G.S.** (2003) A Unified Model for Apical Caspase Activation. *Molecular Cell* **11**(2), 529-541.
- Bockbrader, K.M., Tan, M. & Sun, Y.** (2005) A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **24**(49), 7381-7388.
- Breckenridge, D.G. & Xue, D.** (2004) Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Current Opinion in Cell Biology* **16**(6), 647-652.
- Bremer, E., van Dam, G., Kroesen, B.J., de Leij, L. & Helfrich, W.** (2006) Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects. *Trends in Molecular Medicine* **12**(8), 382-393.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Shilov, A., Hulcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G. & Selivanova, G.** (2002) Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Medicine* **8**(3), 282-288.
- Camacho, F.G., Rodríguez, J.G., Mirón, A.S., García, M.C.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y. & Grima, E.M.** (2007) Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances* **25**(2), 176-194.
- Cavas, L., Baskin, Y., Yurdakoc, K. & Olgun, N.** (2006) Antiproliferative and newly attributed apoptotic activities from an invasive marine alga: *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **339**(1), 111-119.
- Certo, M., Moore, V.D.G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A. & Letai, A.** (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**(5), 351-365.
- Cha, K.H., Koo, S.Y. & Lee, D.** (2008) Antiproliferative Effects of Carotenoids Extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on Human Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 10521-10526.

- Chaleix, V.** (2003) Synthèse et caractérisation de nouvelles porphyrines glucosylées peptidiques à motif RGD en vue de leur application en photothérapie dynamiques. Thèse de Doctorat - Limoges: Faculté des Sciences et Techniques.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E. & Yang, X.** (2002) c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO Journal* **21**(14), 3704-3714.
- Chauhan, D., Catley, L., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Velankar, M., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Yasui, H., Letai, A., Ova, H., Berkers, C., Nicholson, B., Chao, T.H., Neuteboom, S.T.C., Richardson, P., Palladino, M.A. & Anderson, K.C.** (2005) A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell* **8**(5), 407-419.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M. & Huang, D.C.S.** (2005) Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Molecular Cell* **17**(3), 393-403.
- Chen, T., Wong, Y.-S. & Zheng, W.** (2009) Induction of G1 cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells by selenium-enriched Spirulina extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy* doi:10.1016/j.biopha.2009.09.006.
- Choudhari, S.M. & Ananthanarayan, L.** (2007) Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chem.* **102**(1), 77-81.
- Cohen, J.** (1993) Apoptosis. *Immunology Today* **14**(3), 126-130.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M. & Cintas, P.** (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry* **15**(5), 898-902.
- Cuadrado, A., García-Fernández, L.F., González, L., Suárez, Y., Losada, A., Alcaide, V., Martínez, T., Maa Fernández-Sousa, J., Sánchez-Puelles, J.M. & Muñoz, A.** (2003) Aplidin™ induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK. *Journal of Biological Chemistry* **278**(1), 241-250.
- Cuadros, R., Montejo de Garcini, E., Wandosell, F., Faircloth, G., Fernández-Sousa, J.M. & Avila, J.** (2000) The marine compound spisulosine, an inhibitor of cell proliferation, promotes the disassembly of actin stress fibers. *Cancer Letters* **152**(1), 23-29.
- Cuevas, C. & Francesch, A.** (2009) Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural Product Reports* **26**(3), 322-337.
- Cui, Y., Lu, Z., Bai, L., Shi, Z., Zhao, W.-e. & Zhao, B.** (2007) β -Carotene induces apoptosis and up-regulates peroxisome proliferator-activated receptor [γ] expression and reactive oxygen species production in MCF-7 cancer cells. *European Journal of Cancer* **43**(17), 2590-2601.

- Daranas, A.H., Norte, M. & Fernández, J.J.** (2001) Toxic marine microalgae. *Toxicon* **39**(8), 1101-1132.
- Das, S.K., Hashimoto, T. & Kanazawa, K.** (2008) Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1780**(4), 743-749.
- Das, S.K., Hashimoto, T., Shimizu, K., Yoshida, T., Sakai, T., Sowa, Y., Komoto, A. & Kanazawa, K.** (2005) Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1726**(3), 328-335.
- de Bruin, E.C. & Medema, J.P.** (2008) Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews* **34**(8), 737-749.
- de Reviere, B.** (2002) *Biologie et phylogénie des algues*. Belin.
- De Souza, M.V.** (2004) (+)-discodermolide: a marine natural product against cancer. *TheScientificWorldJournal [electronic resource]* **4**, 415-436.
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Angeles Vargas, M., Rivas, J. & Guerrero, M.G.** (2000) Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology* **76**(1), 51-59.
- Deniaud, E., Fleurence, J. & Lahaye, M.** (2003) Preparation and chemical characterization of cell wall fractions enriched in structural proteins from *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Botanica Marina* **46**(4), 366-377.
- Detty, M.R., Gibson, S.L. & Wagner, S.J.** (2004) Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 3897-3915.
- Dias, P.F., Siqueira Jr, J.M., Maraschin, M., Ferreira, A.G., Gagliardi, A.R. & Ribeiro-do-Valle, R.M.** (2008) A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. *Microvascular Research* **75**(1), 34-44.
- Dokmanovic, M. & Marks, P.A.** (2005) Prospects: Histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry* **96**(2), 293-304.
- Donepudi, M., Sweeney, A.M., Briand, C. & Grütter, M.G.** (2003) Insights into the Regulatory Mechanism for Caspase-8 Activation. *Molecular Cell* **11**(2), 543-549.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X.** (2000) Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* **102**(1), 33-42.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K.N. & Ravishankar, G.A.** (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology* **16**(9), 389-406.

- Dunlap, W.C., Battershill, C.N., Liptrot, C.H., Cobb, R.E., Bourne, D.G., Jaspars, M., Long, P.F. & Newman, D.J. (2007) Biomedicinals from the phytosymbionts of marine invertebrates: A molecular approach. *Methods* **42**(4), 358-376.
- Edwards, D.J., Marquez, B.L., Nogle, L.M., McPhail, K., Goeger, D.E., Roberts, M.A. & Gerwick, W.H. (2004) Structure and Biosynthesis of the Jamaicamides, New Mixed Polyketide-Peptide Neurotoxins from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chemistry & Biology* **11**(6), 817-833.
- Esteban, R., Balaguer, L., Manrique, E., Rubio de Casas, R., Ochoa, R., Fleck, I., Pinto-Marijuan, M., Casals, I., Morales, D., Jiménez, M.S., Lorenzo, R., Artetxe, U., Becerril, J.M. & Garcia-Plazaola, J.I. (2009) Alternative methods for sampling and preservation of photosynthetic pigments and tocopherols in plant material from remote locations. *Photosynthesis Research* **101**(1), 77-88.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A.B. & Henson, P.M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**(6782), 85-90.
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. & Fenical, W. (2003) Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie - International Edition* **42**(3), 355-357.
- Fenical, W., Jensen, P.R., Palladino, M.A., Lam, K.S., Lloyd, G.K. & Potts, B.C. (2009) Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **17**(6), 2175-2180.
- Fleischer, B., Schulze-Bergkamen, H., Schuchmann, M., Weber, A., Biesterfeld, S., Müller, M., Krammer, P.H. & Galle, P.R. (2006) Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*. **28**(1), 25-32.
- Folmer, F., Jaspars, M., Dicato, M. & Diederich, M. (2010) Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochemistry Reviews*, 1-23.
- Fратиanni, A., Cinquanta, L. & Panfili, G. (2010) Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Science and Technology* **43**(6), 867-871.
- Gachard-Bouty, L. (2003) L'utilisation de la méthanèse des alcènes pour la synthèse de porphyrines O- et C-glycosylées éthyléniques : application à la photothérapie dynamique Vol. Thèse de Doctorat - Limoges: Faculté des Sciences et Techniques.
- Gajate, C., An, F. & Mollinedo, F. (2002) Differential cytostatic and apoptotic effects of ecteinascidin-743 in cancer cells: Transcription-dependent cell cycle arrest and transcription-independent JNK and mitochondrial mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **277**(44), 41580-41589.
- García-Fernández, L.F., Losada, A., Alcaide, V., Álvarez, A.M., Cuadrado, A., González, L., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Fernández-Sousa, J.M., Muñoz, A. & Sánchez-Puelles, J.M. (2002) Aplidin™ induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C δ . *Oncogene* **21**(49), 7533-7544.

- Garczarek, L.** (2000) Caractérisation biochimique et génétique des complexes pigments protéines chez le procaryote marin *Phlochlorococcus* : origine évolutive et rôle dans l'adaptation de l'appareil photosynthétique aux conditions lumineuses. Thèse de Doctorat - Paris-Grignon: Institut National Agronomique.
- Garett, R.H. & Grisham, C.M.** (1999) *Biochemistry*. Saunders College Publishing.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A. & Todaro, G.J.** (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51**(5), 1417-1423.
- Glaser, K.B. & Mayer, A.M.S.** (2009) A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical Pharmacology* **78**(5), 440-448.
- Gross, H., Goeger, D.E., Hills, P., Mooberry, S.L., Ballantine, D.L., Murray, T.F., Valeriote, F.A. & Gerwick, W.H.** (2006) Lophocladines, bioactive alkaloids from the red alga *lophocladia* sp. *Journal of Natural Products* **69**(4), 640-644.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G. & Collier, J.** (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions *Microbiological Reviews* **57**, 725-749.
- Guignard, J.** (2000) *Biochimie végétale*. Dunod.
- Haefner, B.** (2003) Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* **8**(12), 536-544.
- Hamann, M.T., Otto, C.S., Scheuer, P.J. & Dunbar, D.C.** (1996) Kahalalides: Bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and its algal diet *Bryopsis* sp. *Journal of Organic Chemistry* **61**(19), 6594-6600.
- Hamann, M.T. & Scheuer, P.J.** (1993) Kahalalide F: A bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp. *Journal of the American Chemical Society* **115**(13), 5825-5826.
- Han, B., Goeger, D., Maier, C.S. & Gerwick, W.H.** (2005) The wewakpeptins, cyclic depsipeptides from a Papua new guinea collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya semiplena*. *Journal of Organic Chemistry* **70**(8), 3133-3139.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.** (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hejazi, M.A., De Lamarliere, C., Rocha, J.M.S., Vermuë, M., Tramper, J. & Wijffels, R.H.** (2002) Selective extraction of carotenoids from the microalga *Dunaliella salina* with retention of viability. *Biotechnology and Bioengineering* **79**(1), 29-36.
- Herrero, A.B., Martín-Castellanos, C., Marco, E., Gago, F. & Moreno, S.** (2006) Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Research* **66**(16), 8155-8162.

- Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T. & Miyashita, K.** (2004) Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1675**(1-3), 113-119.
- Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., Odashima, S. & Takahashi, K.** (1999) Apoptosis-Inducing Effect of Fucoxanthin on Human Leukemia Cell Line HL-60. *Food Science and Technology Research* **5**(3), 243-246.
- Hung, D.T., Chen, J. & Schreiber, S.L.** (1996) (+)-Discodermolide binds to microtubules in stoichiometric ratio to tubulin dimers, blocks taxol binding and results in mitotic arrest. *Chemistry and Biology* **3**(4), 287-293.
- Hyer, M.L., Samuel, T. & Reed, J.C.** (2006) The FLIP-Side of Fas Signaling. *Clinical Cancer Research* **12**(20), 5929-5931.
- Isakov, N., Galron, D., Mustelin, T., Pettit, G.R. & Altman, A.** (1993) Inhibition of phorbol ester-induced T cell proliferation by bryostatin is associated with rapid degradation of protein kinase C. *Journal of Immunology* **150**(4), 1195-1204.
- Jackson, K.L., Henderson, J.A. & Phillips, A.J.** (2009) The halichondrins and E7389. *Chemical Reviews* **109**(7), 3044-3079.
- Jaren-Galan, M., Nienaber, U. & Schwartz, S.J.** (1999) Paprika (*Capsicum annuum*) oleoresin extraction with supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(9), 3558-3564.
- Jeffrey, S.W.** (1981) An improved thin-layer chromatographic technique for marine phytoplankton pigments. *American Society of Limnology and Oceanography* **26**(1), 191-197.
- Jeffrey, S.W. & Hallegraeff, G.M.** (1987) Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton : a problem for chlorophyll analysis. *Marine Ecology - Progress Series* **35**, 293-304.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W.** (1997) *Phytoplankton pigments in oceanography*. UNESCO publishing.
- Jordan, M.A., Kamath, K., Manna, T., Okouneva, T., Miller, H.P., Davis, C., Littlefield, B.A. & Wilson, L.** (2005) The primary antimitotic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. *Molecular Cancer Therapeutics* **4**(7), 1086-1095.
- Kadam, S.U. & Prabhasankar, P.** (2010) Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Research International* **43**(8), 1975-1980.
- Kauffer, B., Bénard, C., Lahaye, M., Blottière, H.M. & Cherbut, C.** (1999) Biological properties of Ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. *Planta Medica* **65**(6), 527-531.

- Kalemkerian, G.P., Ou, X., Adil, M.R., Rosati, R., Khoufani, M.M., Madan, S.K. & Pettit, G.R.** (1999) Activity of dolastatin 10 against small-cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*: Induction of apoptosis and bcl-2 modification. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **43**(6), 507-515.
- Kanoh, K., Kohno, S., Asari, T., Harada, T., Katada, J., Muramatsu, M., Kawashima, H., Sekiya, H. & Uno, I.** (1997) (-)-phenylahistin: A new mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus ustus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **7**(22), 2847-2852.
- Karboune, S., Neufeld, R. & Kermasha, S.** (2005) Immobilization and biocatalysis of chlorophyllase in selected organic solvent systems. *J. Biotechnol.* **120**(3), 273-283.
- Karp** (2010) *Biologie cellulaire et moléculaire*. De Boeck Université.
- Kerr, J.** (1972) Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
- Kim, D.H., Kim, J.H., Bae, S.E., Seo, J.H., Oh, T.K. & Lee, C.H.** (2005) Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus* species xylanase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(7), 2541-2545.
- Kim, K.-N., Heo, S.-J., Kang, S.-M., Ahn, G. & Jeon, Y.-J.** (2010) Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicology in Vitro* **24**(6), 1648-1654.
- Kladi, M., Xenaki, H., Vagias, C., Papazafiri, P. & Roussis, V.** (2006) New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron* **62**(1), 182-189.
- Klejduš, B., Kopecký, J., Benesová, L. & Vacek, J.** (2009) Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A* **1216**(5), 763-771.
- Kobayashi, J. & Ishibashi, M.** (1997) Amphidinolides: unique macrolides from previous term marine dinoflagellates. *Heterocycles* **44**, 543-572.
- Kobayashi, J., Yamaguchi, N. & Ishibashi, M.** (1994) Amphidinin A, a novel amphidinolide-related metabolite from the cultured marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron Letters* **35**(38), 7049-7050.
- Kobayashi, M., Natsume, T., Tamaoki, S., Watanabe, J.I., Asano, H., Mikami, T., Miyasaka, K., Miyazaki, K., Gondo, M., Sakakibara, K. & Tsukagoshi, S.** (1997) Antitumour activity of TZT-1027, a novel Dolastatin 10 derivative. *Japanese Journal of Cancer Research* **88**(3), 316-327.
- Kornprobst, J.-M.** (2005) *Substances naturelles d'origine marine - Chimiodiversité - Pharmacodiversité - Biotechnologies*. Paris: Lavoisier.
- Kortmansky, J. & Schwartz, G.K.** (2003) Bryostatin-1: A Novel PKC Inhibitor in Clinical Development. *Cancer Investigation* **21**(6), 924-936.

- Kotake-Nara, E., Asai, A. & Nagao, A.** (2005) Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Letters* **220**(1), 75-84.
- Kotamraju, S., Kalivendi, S.V., Konorev, E., Chitambar, C.R., Joseph, J. & Kalyanaraman, B.** (2004) Oxidant-Induced Iron Signaling in Doxorubicin-Mediated Apoptosis. In *Methods in Enzymology*, Vol. 378, pp. 362-382.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R. & Newmeyer, D.D.** (2005) BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Molecular Cell* **17**(4), 525-535.
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R. & Newmeyer, D.D.** (2002) Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane. *Cell* **111**(3), 331-342.
- Kuznetsov, G., TenDyke, K., Towle, M., Cheng, H., Liu, J., Marsh, J.P., Schiller, S.E.R., Spyvee, M.R., Yang, H., Seletsky, B.M., Shaffer, C.J., Marceau, V., Yao, Y., Suh, E.M., Campagna, S., Fang, F.G., Kowalczyk, J.J. & Littlefield, B.A.** (2009) Tubulin-based antimitotic mechanism of E7974, a novel analogue of the marine sponge natural product hemiasterlin. *Molecular Cancer Therapeutics* **8**(10), 2852-2860.
- Kwon, H.-J., Bae, S.-Y., Kim, K.-H., Han, C.-H., Cho, S.-H., Nam, S.-W., Choi, Y.H. & Kim, B.-W.** (2007) Induction of apoptosis in HeLa cells by ethanolic extract of *Corallina pilulifera*. *Food Chemistry* **104**(1), 196-201.
- Kwon, M.-J. & Nam, T.-J.** (2007) A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. *Cell Biology International* **31**(8), 768-775.
- Leal, J.F.M., García-Hernández, V., Moneo, V., Domingo, A., Bueren-Calabuig, J.A., Negri, A., Gago, F., Guillén-Navarro, M.J., Avilés, P., Cuevas, C., García-Fernández, L.F. & Galmarini, C.M.** (2009) Molecular pharmacology and antitumor activity of *Zalypsis*® in several human cancer cell lines. *Biochemical Pharmacology* **78**(2), 162-170.
- Lechat, P.** (2006) Pharmacologie - DCEM1. In *Faculté de médecine Pierre et Marie Curie: Paris-VI*.
- Lee, H.S. & Coates, G.A.** (2003) Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **36**(1), 153-156.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y. & Oh, H.-M.** (2010) Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* **101**(1, Supplement 1), S75-S77.
- Leek, R.D., Stratford, I. & Harris, A.L.** (2005) The role of hypoxia-inducible factor-1 in three-dimensional tumor growth, apoptosis, and regulation by the insulin-signaling pathway. *Cancer Research* **65**(10), 4147-4152.

- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S. & Korsmeyer, S.J.** (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**(3), 183-192.
- Li, D., Williams, J.I. & Pietras, R.J.** (2002) Squalamine and cisplatin block angiogenesis and growth of human ovarian cancer cells with or without HER-2 gene overexpression. *Oncogene* **21**(18), 2805-2814.
- Li, H.-B., Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Fan, K.-W., Chen, F. & Jiang, Y.** (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* **102**(3), 771-776.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.-j. & Yuan, J.** (1998) Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* **94**(4), 491-501.
- Ling, Y.H., Aracil, M., Jimeno, J., Perez-Soler, R. & Zou, Y.** (2009) Molecular pharmacodynamics of PM02734 (elisidepsin) as single agent and in combination with erlotinib; synergistic activity in human non-small cell lung cancer cell lines and xenograft models. *European Journal of Cancer* **45**(10), 1855-1864.
- Liu, F.-T. & Rabinovich, G.A.** (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer* **5**(1), 29-41.
- Longley, R.E., Gunasekera, S.P., Faherty, D., McLane, J. & Dumont, F.** (1993) Immunosuppression by discodermolide. *Annals of the New York Academy of Sciences* **696**, 94-107.
- Lorenz, R.T. & Cysewski, G.R.** (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology* **18**(4), 160-167.
- López-Macià, A., Jiménez, J.C., Royo, M., Giralt, E. & Albericio, F.** (2001) Synthesis and structure determination of kahalalide F. *Journal of the American Chemical Society* **123**(46), 11398-11401.
- Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M. & Montero, O.** (2005) Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering* **66**(2), 245-251.
- Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M. & Montero, O.** (2007) Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. *The Journal of Supercritical Fluids* **39**(3), 323-329.
- Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M. & Montero, O.** (2009a) Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta* **77**(3), 948-952.

- Macías-Sánchez, M.D., Serrano, C.M., Rodríguez, M.R. & Martínez de la Ossa, E.** (2009b) Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO₂ and ethanol as cosolvent. *Chemical Engineering Journal* **150**(1), 104-113.
- Mallucci, L., Wells, V., Danikas, A. & Davies, D.** (2003) Turning cell cycle controller genes into cancer drugs: A role for an antiproliferative cytokine (β -GBP). *Biochemical Pharmacology* **66**(8), 1563-1569.
- Mani, A. & Gelmann, E.P.** (2005) The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **23**(21), 4776-4789.
- Manzan, A.C.C.M., Toniolo, F.S., Bredow, E. & Povh, N.P.** (2003) Extraction of Essential Oil and Pigments from *Curcuma longa* [L.] by Steam Distillation and Extraction with Volatile Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(23), 6802-6807.
- Martello, L.A., McDaid, H.M., Regl, D.L., Yang, C.H., Meng, D., Pettus, T.R.R., Kaufman, M.D., Arimoto, H., Danishefsky, S.J., Smith Iii, A.B. & Horwitz, S.B.** (2000) Taxol and discodermolide represent a synergistic drug combination in human carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research* **6**(5), 1978-1987.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S.** (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(1), 217-232.
- Mayer, A.M.S., Glaser, K.B., Cuevas, C., Jacobs, R.S., Kem, W., Little, R.D., McIntosh, J.M., Newman, D.J., Potts, B.C. & Shuster, D.E.** (2010) The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**(6), 255-265.
- Mayer, A.M.S. & Gustafson, K.R.** (2006) Marine pharmacology in 2003-2004: Anti-tumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer* **42**(14), 2241-2270.
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P. & Palavra, A.F.** (2003) Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta* **356**, 328-334.
- Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E. & Señoráns, F.J.** (2007) Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry* **102**(4), 1357-1367.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J.r., Nicholson, D.W., Briand, C. & Grütter, M.G.** (2002) The Long Form of FLIP Is an Activator of Caspase-8 at the Fas Death-inducing Signaling Complex. *Journal of Biological Chemistry* **277**(47), 45162-45171.
- Milledge, J.** (2010) Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1-11.
- Minucci, S. & Pelicci, P.G.** (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer* **6**(1), 38-51.

- Mitra, A. & Sept, D.** (2004) Localization of the Antimitotic Peptide and Depsipeptide Binding Site on β -Tubulin. *Biochemistry* **43**(44), 13955-13962.
- Moore, K.S., Wehrli, S., Roder, H., Rogers, M., Forrest, J.N., McCrimmon, D. & Zasloff, M.** (1993) Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(4), 1354-1358.
- Moreau, D., Thomas-Guyon, H., Jacquot, C., Jugé, M., Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Piovetti, L. & Roussakis, C.** (2006a) An extract from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* induces irreversible arrest of cell proliferation in a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Journal of Applied Phycology* **18**(1), 87-93.
- Moreau, D., Tomasoni, C., Jacquot, C., Kaas, R., Le Guedes, R., Cadoret, J.-P., Muller-Feuga, A., Kontiza, I., Vagias, C., Roussis, V. & Roussakis, C.** (2006b) Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **22**(1), 97-103.
- Mosmann, T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**(1-2), 55-63.
- Nagata, S.** (1997) Apoptosis by Death Factor. *Cell* **88**(3), 355-365.
- Nakazawa, Y., Sashima, T., Hosokawa, M. & Miyashita, K.** (2009) Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *Journal of Functional Foods* **1**(1), 88-97.
- Natori, T., Morita, M., Akimoto, K. & Koezuka, Y.** (1994) Agelasphins, novel antitumor and immunostimulatory cerebroside from the marine sponge *Agelas mauritanus*. *Tetrahedron* **50**(9), 2771-2784.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. & Battershill, C.N.** (2009) Therapeutic agents from the sea: Biodiversity, chemo-evolutionary insight and advances to the end of Darwin's 200th year. *Diving and Hyperbaric Medicine* **39**(4), 216-225.
- Nicholson, B., Lloyd, G.K., Miller, B.R., Palladino, M.A., Kiso, Y., Hayashi, Y. & Neuteboom, S.T.C.** (2006) NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: In-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. *Anti-Cancer Drugs* **17**(1), 25-31.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Tokuda, H. & Satomi, Y.** (2009) Cancer prevention by carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **483**(2), 165-168.
- Nishino, H., Tokuda, H., Murakoshi, M., Satomi, Y., Masuda, M., Onozuka, M., Yamaguchi, S., Takayasu, J., Tsuruta, J., Okuda, M., Khachik, F., Narisawa, T., Takasuka, N. & Yano, M.** (2000) Cancer prevention by natural carotenoids. *BioFactors* **13**(1-4), 89-94.

- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. & Capaccioli, S.** (2009) Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research* **59**(6), 365-378.
- Okouneva, T., Azarenko, O., Wilson, L., Littlefield, B.A. & Jordan, M.A.** (2008) Inhibition of centromere dynamics by eribulin (E7389) during mitotic metaphase. *Molecular Cancer Therapeutics* **7**(7), 2003-2011.
- Olaizola, M.** (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering* **20**(4-6), 459-466.
- Olivera, B.M.** (2000) *ω -Conotoxin MVIIA: from previous term marinenext term snail venom to analgesic drug*. N.Fusetani.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., Joseph, M.K., Kitada, S., Korsmeyer, S.J., Kunzer, A.R., Letai, A., Li, C., Mitten, M.J., Nettesheim, D.G., Ng, S., Nimmer, P.M., O'Connor, J.M., Oleksijew, A., Petros, A.M., Reed, J.C., Shen, W., Tahir, S.K., Thompson, C.B., Tomaselli, K.J., Wang, B., Wendt, M.D., Zhang, H., Fesik, S.W. & Rosenberg, S.H.** (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**(7042), 677-681.
- Ozenda, P.** (2000) *Les végétaux organisation et diversité biologique*. Dunod.
- Palermo, J.A., Flower, P.B. & Seldes, A.M.** (1992) Chondriamides A and B, new indolic metabolites from the red alga *Chondria* sp. *Tetrahedron Letters* **33**(22), 3097-3100.
- Palozza, P., Calviello, G., Serini, S., Maggiano, N., Lanza, P., Ranelletti, F.O. & Bartoli, G.M.** (2001) β -carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* **30**(9), 1000-1007.
- Parsons, T.R., Maita, Y. & Lalli, C.M.** (1984) *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Oxford: Pergamon Press.
- Pec, M.K., Aguirre, A., Moser-Thier, K., Fernández, J.J., Souto, M.L., Dorta, J., Díaz-González, F. & Villar, J.** (2003) Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. *Biochemical Pharmacology* **65**(9), 1451-1461.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E. & Bashan, Y.** (2010) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* doi:10.1016/j.watres.2010.08.037.
- Pettit, G.R., Fujii, Y., Hasler, J.A. & Schmidt, J.M.** (1982) Isolation and Characterization of Palystatins A-D. *Journal of Natural Products* **45**(3), 272-276.
- Pettit, G.R., Kamano, Y., Fujii, Y., Herald, C.L., Inoue, M., Brown, P., Gust, D., Kitahara, K., Schmidt, J.M., Doubek, D.L. & Michael, C.** (1981) Marine Animal Biosynthetic Constituents For Cancer Chemotherapy. *Journal of Natural Products* **44**(4), 482-485.

- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S. & Salvesen, G.S.** (2006) The Apoptosome Activates Caspase-9 by Dimerization. *Molecular Cell* **22**(2), 269-275.
- Ravatn, R., Wells, V., Nelson, L., Vettori, D., Mallucci, L. & Chin, K.-V.** (2005) Circumventing Multidrug Resistance in Cancer by β -Galactoside Binding Protein, an Antiproliferative Cytokine. *Cancer Research* **65**(5), 1631-1634.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A. & Costa, H.S.** (2006) Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis* **19**(2-3), 97-111.
- Rosset, R., Claude, M. & Jardy, A.** (1991) *Chromatographie en phase liquide et supercritique*. Masson.
- Rostagno, M.A., Palma, M. & Barroso, C.G.** (2007) Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica Chimica Acta* **597**(2), 265-272.
- Roy, N.** (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **80**, 167-178.
- Ruiz, G.** (2005) Extraction, Détermination structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algue Rouges. Thèse de Doctorat - Limoges: Faculté des Sciences et Techniques.
- Sachindra, N.M., Bhaskar, N. & Mahendrakar, N.S.** (2005) Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. *LWT - Food Science and Technology* **38**(3), 221-225.
- Saito, K., Nishijima, M., Ohno, N., Yadomae, T. & Miyazaki, T.** (1992) Structure and antitumor activity of the less-branched derivatives of an alkali-soluble glucan isolated from *Omphalia lapidescens*. (Studies on fungal polysaccharide. XXXVIII). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **40**(1), 261-263.
- Sánchez, A.M., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., Vara, D., Cuevas, C. & Díaz-Laviada, I.** (2008) Spisulosine (ES-285) induces prostate tumor PC-3 and LNCaP cell death by *de novo* synthesis of ceramide and PKC- ζ activation. *European Journal of Pharmacology* **584**(2-3), 237-245.
- Sashidhara, K.V., White, K.N. & Crews, P.** (2009) A Selective Account of Effective Paradigms and Significant Outcomes in the Discovery of Inspirational Marine Natural Products *Journal of Natural Products* **72**(3), 588-603.
- Satomi, Y. & Nishino, H.** (2009) Implication of mitogen-activated protein kinase in the induction of G1 cell cycle arrest and gadd45 expression by the carotenoid fucoxanthin in human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1790**(4), 260-266.
- Schimmer, A.D.** (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: Translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Research* **64**(20), 7183-7190.

- Scott, J.D. & Williams, R.M.** (2002) Chemistry and biology of the tetrahydroisoquinoline antitumor antibiotics. *Chemical Reviews* **102**(5), 1669-1730.
- Sharp, D.A., Lawrence, D.A. & Ashkenazi, A.** (2005) Selective Knockdown of the Long Variant of Cellular FLICE Inhibitory Protein Augments Death Receptor-mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **280**(19), 19401-19409.
- Shimizu, Y.** (2003) Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology* **6**(3), 236-243.
- Sievers, E.L.** (2003) Antibody-targeted chemotherapy of acute myeloid leukemia using gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg). *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **31**(1), 7-10.
- Simmons, T.L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P. & Gerwick, W.H.** (2005) Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics* **4**(2), 333-342.
- Smit, A.J.** (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology* **16**(4), 245-262.
- Soule, H.D., Vazquez, J. & Long, A.** (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **51**(5), 1409-1416.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M. & Salvesen, G.S.** (1999) Caspase-9 Can Be Activated without Proteolytic Processing. *Journal of Biological Chemistry* **274**(13), 8359-8362.
- Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R.** (1972) *A practical handbook of seawater analysis*. Bull. Fish. Res. Bd. Can.
- Sun, Y., Ma, G., Ye, X., Kakuda, Y. & Meng, R.** (2009) Stability of all-trans- β -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. *Ultrasonics Sonochemistry* **17**(4), 654-661.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. & Takahashi, R.** (2001) A Serine Protease, HtrA2, Is Released from the Mitochondria and Interacts with XIAP, Inducing Cell Death. *Molecular Cell* **8**(3), 613-621.
- Takebayashi, Y., Pourquier, P., Zimonjic, D.B., Nakayama, K., Emmert, S., Ueda, T., Urasaki, Y., Kanzaki, A., Akiyama, S.I., Popescu, N., Kraemer, K.H. & Pommier, Y.** (2001) Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Medicine* **7**(8), 961-966.
- Talpir, R., Benayahu, Y., Kashman, Y., Pannell, L. & Schleyer, M.** (1994) Hemiasterlin and geodiamolide TA; two new cytotoxic peptides from the marine sponge *hemiasterella minor* (Kirkpatrick). *Tetrahedron Letters* **35**(25), 4453-4456.
- Tan, L.T.** (2007) Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* **68**(7), 954-979.

- Tsuda, M., Endo, T. & Kobayashi, J.** (2000) Amphidinolide T, novel 19-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Journal of Organic Chemistry* **65**(5), 1349-1352.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. & Vaux, D.L.** (2000) Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* **102**(1), 43-53.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J.** (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408**(6810), 307-310.
- von Schwarzenberg, K. & Vollmar, A.M.** (2010) Marine compounds as lead structures and chemical tools for cancer therapy. *Cancer Letters* doi:10.1016/j.canlet.2010.07.004.
- Wall, N.R., Mohammad, R.M. & Al-Katib, A.M.** (1999) Bax:Bcl-2 ratio modulation by bryostatin 1 and novel antitubulin agents is important for susceptibility to drug induced apoptosis in the human early pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line, Reh. *Leukemia Research* **23**(10), 881-888.
- Wang, H.-M., Pan, J.-L., Chen, C.-Y., Chiu, C.-C., Yang, M.-H., Chang, H.-W. & Chang, J.-S.** (2010) Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochemistry* doi:10.1016/j.procbio.2010.05.023.
- Wang, J.-X., Xiao, X.-H. & Li, G.-K.** (2008) Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs. *Journal of Chromatography A* **1198-1199**, 45-53.
- Wang, L. & Weller, C.L.** (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* **17**(6), 300-312.
- Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J.** (2001) Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* **292**(5517), 727-730.
- Wender, P.A., Cribbs, C.M., Koehler, K.F., Sharkey, N.A., Herald, C.L., Kamano, Y., Pettit, G.R. & Blumberg, P.M.** (1988) Modeling of the bryostatins to the phorbol ester pharmacophore on protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(19), 7197-7201.
- Wright, A.E., Forleo, D.A., Gunawardana, G.P., Gunasekera, S.P., Koehn, F.E. & McConnell, O.J.** (1990) Antitumor tetrahydroisoquinoline alkaloids from the colonial ascidian *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Organic Chemistry* **55**(15), 4508-4512.
- Xiao, X.-H., Wang, J.-X., Wang, G., Wang, J.-Y. & Li, G.-K.** (2009) Evaluation of vacuum microwave-assisted extraction technique for the extraction of antioxidants from plant samples. *Journal of Chromatography A* **1216**(51), 8867-8873.

- Yamazaki, Y., Kohno, K., Yasui, H., Kiso, Y., Akamatsu, M., Nicholson, B., Deyanat-Yazdi, G., Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G.K. & Hayashi, Y.** (2008) Tubulin photoaffinity labeling with biotin-tagged derivatives of potent diketopiperazine antimicrotubule agents. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **9**(18), 3074-3081.
- Yang, G., Schmieg, J., Tsuji, M. & Franck, R.W.** (2004) The C-Glycoside Analogue of the Immunostimulant α -Galactosylceramide (KRN7000): Synthesis and Striking Enhancement of Activity. *Angewandte Chemie International Edition* **43**(29), 3818-3822.
- Yang, H., Hoshino, K., Sanchez-Gonzalez, B., Kantarjian, H. & Garcia-Manero, G.** (2005) Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. *Leukemia Research* **29**(7), 739-748.
- Yokota, J.** (2000) Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21**(3), 497-503.
- You, B. & Trillet-Lenoir, V.** (2006) Thérapeutiques anticancéreuses ciblées. *La Revue de Médecine Interne* **27**(Supplement 3), S285-S288.
- Yuan, Y.V. & Walsh, N.A.** (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology* **44**(7), 1144-1150.
- Zewail-Foote, M. & Hurley, L.H.** (2001) Differential rates of reversibility of ecteinascidin 743-DNA covalent adducts from different sequences lead to migration to favored bonding sites. *Journal of the American Chemical Society* **123**(27), 6485-6495.
- Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Lann, K.L., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M. & Deslandes, E.** (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry* **116**(3), 693-701.

Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines

Résumé :

Les organismes marins, dont les microalgues, constituent un champ d'investigation majeur pour la découverte de nouveaux médicaments anticancéreux. Pour mettre en évidence de nouvelles molécules anticancéreuses, nous avons adopté une démarche bioguidée sur des extraits de microalgues marines présentant une activité antiproliférative. Ce travail a conduit à l'isolement de la violaxanthine, pigment caroténoïde époxydé, et à la démonstration de son activité antiproliférative, cytotoxique, pro-apoptotique et pro-nécrotique sur la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7. Des caroténoïdes tels que la fucoxanthine sont déjà connus pour présenter une activité anticancéreuse liée à leur fonction époxyde. Cependant, cette étude est la première à montrer le potentiel de la violaxanthine.

Afin d'isoler d'autres pigments microalgaux potentiellement anticancéreux, des méthodes de CLHP efficaces ont été développées pour leur analyse et leur purification. Puis, des méthodes classiques d'extraction de pigments issus de microalgues ont été comparées à des méthodes d'extraction innovantes. Cette étude a permis de montrer l'intérêt de la technologie micro-onde en termes d'efficacité et de rapidité pour l'extraction des pigments de microalgues frustulées (diatomées). Plus largement, ce travail confirme le potentiel des microalgues marines comme source de molécules anticancéreuses, et démontre l'intérêt de la technologie micro-onde pour l'extraction de molécules à activité biologique issues de produits naturels.

Mots clés : cancer, microalgues, pigment, violaxanthine, extraction sous irradiation micro-onde

Bio-guided research of anticancer molecules from marine microalgae

Abstract:

Marine organisms, including microalgae, constitute a major field of investigation for the discovery of new anticancer drugs. To obtain new anticancer compounds, we used a bio-guided methodology on microalgae extracts showing antiproliferative activity. This work led to the isolation of violaxanthin, an epoxy-carotenoid pigment, and to the demonstration of its antiproliferative, cytotoxic, pro-apoptotic and pro-necrotic activity. Carotenoids such as fucoxanthin are already known to have anticancer activity related to the epoxide. However, this is the first study demonstrating the potential of violaxanthin.

In order to isolate other pigments with anticancer activity, efficient HPLC methods were developed for their analysis and purification. Then, conventional methods of pigments extraction from microalgae were compared to innovative methods of extraction. This study demonstrates the interest of microwave technology in terms of efficiency and rapidity for the pigments extraction from frustulated microalgae (diatoms).

To conclude, this work confirms the potential of marine microalgae as a source of anticancer drugs, and demonstrates the interest of microwave technology for the extraction of biologically active molecules from natural products.

Keywords : cancer, microalgae, pigment, violaxanthin, microwave assisted extraction



Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés

UMR 6250 CNRS

Avenue Michel Crépeau - Bâtiment Marie Curie

17042 La Rochelle Cédex 1

