



HAL
open science

Production pilote de polysaccharides sulfatés issus de macroalgues marines à visées anti-coagulante et cosmétique anti-âge

Amandine Adrien Dit Richard

► To cite this version:

Amandine Adrien Dit Richard. Production pilote de polysaccharides sulfatés issus de macroalgues marines à visées anti-coagulante et cosmétique anti-âge. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2016. Français. NNT : 2016LAROS013 . tel-02003626

HAL Id: tel-02003626

<https://theses.hal.science/tel-02003626>

Submitted on 1 Feb 2019

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

Sciences pour l'Environnement Gay-Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS-ULR
Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé (AMES)

THESE CONFIDENTIELLE

Présentée par :

Amandine ADRIEN DIT RICHARD

Soutenance le 28 Juin 2016

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de la Rochelle
Discipline : Valorisation chimique et biologique des agroressources

**Production pilote de polysaccharides sulfatés issus de
macroalgues marines à visées anti-coagulante et
cosmétique anti-âge**

JURY:

Mr MICHAUD Philippe

Mme BOURGOUGNON Nathalie

Mme CHOMARAT Nadine

Mr PIOT Jean-Marie

Mr MAUGARD Thierry

Mr BAUDOIN Stanislas

Mr BRIDIAU Nicolas

Professeur, Polytech Clermont-Ferrand, Rapporteur

Professeur, Université de Bretagne Sud, Vannes Rapportrice

Responsable développement biochimie, Institut Pierre Fabre,
Gaillac, Examinatrice

Professeur, Université de La Rochelle, Examineur

Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse

PDG de SEPROSYS, La Rochelle, Encadrant scientifique

Maitre de conférences, Université de La Rochelle, Encadrant
scientifique

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Brevets :

- **Adrien A.**, Bridiau N., Maugard T., Dufour D., Baudouin S., Demande déposée en janvier 2016. Ulvanes sulfatés et utilisation dans la régulation des troubles de la coagulation. **Numéro de demande FR1650735**
- **Adrien A.**, Bridiau N., Maugard T., Dufour D., Baudouin S., Demande déposée en octobre 2016. Utilisation d'un extrait d'ulve comme agent cosmétique anti-age. **Numéro de demande FR1670618**
- **Adrien A.**, Bridiau N., Maugard T., Dufour D., Baudouin S., Demande déposée en janvier 2017. Fractions protéiques extraites de macroalgues marines stimulant la production de collagène par des fibroblastes dermiques humains. **En cours**

Publications :

- **Adrien, A.**, Baudouin, S., Dufour, D., Maugard, T., Bridiau N., 2017. Evaluation of the anticoagulant potential of polysaccharide-rich fractions extracted from macroalgae. *Natural Product Research*, doi : 10.1080/14786419.2017.1278595
- **Adrien, A.**, Maugard, T., Baudouin, S., Dufour, D., Bridiau N., Effect of sulfation on the anticoagulant activity of ulvans extracted from the green macroalgae *Ulva sp.* **A soumettre**
- **Adrien, A.**, Maugard, T., Baudouin, S., Dufour, D., Retailleau J., Bridiau N., Stimulating effects of macroalgae extracts on collagen synthesis in cultured human dermal fibroblasts *in vitro*. **A soumettre**
- **Adrien, A.**, Bonnet A., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T., Bridiau N., 2017. Pilot Production of Ulvans from *Ulva Sp.* and Their Effects on Hyaluronan and Collagen Production in Cultured Dermal Fibroblasts. *Carbohydrate Polymers* 157 (février): 1306-14.

Communications orales :

- Journées de la Société Phycologique de France du 23 au 25 septembre 2015, Vannes, France. Activité anticoagulante d'extraits de macroalgues enrichis en polysaccharides sulfatés. **Adrien A.**, Bonnet A., Dufour D., Baudouin S., Maugard T., Bridiau N.
- Sixth International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, 29 mai-1er juin 2016, Coimbra, Portugal. Evaluation of the anticoagulant potential of polysaccharide-rich fractions extracted from macroalgae. **Adrien A.**, Bonnet A., Dufour D., Baudouin S., Maugard T., **Bridiau N.**

Communications par posters :

- 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting du 10 au 13 mai 2015, Helsinki, Finlande. Anticoagulant activity of sulfated polysaccharide-rich macroalgae extracts.
Adrien A., Bonnet A., Dufour D., Baudouin S., Maugard T., Bridiau N.
- 9th European Conference on Marine Natural Products du 30 août au 2 septembre 2015, Glasgow, Scotland. Evaluation of the anti-coagulant potential of polysaccharide-rich fractions of macroalgae and influence of structure modifications of ulvans on their anti-coagulant activity.
Adrien A., Bonnet A., Dufour D., Baudouin S., Maugard T., Bridiau N.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier la société SEPROSYS, L'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie, l'Ecole Doctorale Gay Lussac, ainsi que le Laboratoire LIENSs de l'Université de La Rochelle d'avoir financé, encadré et soutenu cette thèse CIFRE. Je les remercie également de m'avoir permis de mener à bien ce projet de recherche.

Je remercie Mme Nathalie BOURGOUGNON, Mr Philippe MICHAUD, Mme Nadine CHOMARAT et Mr Jean-Marie PIOT, membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci également à Mme Nathalie BOURGOUGNON, Mr Philippe MICHAUD et Mr Joël FLEURENCE d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Je souhaite remercier Mr Olivier DE VIRON, de m'avoir accueilli dans le laboratoire LIENSs-UMR7266 et Mr Stanislas BAUDOUIN de m'avoir accueilli au sein de SEPROSYS.

Je voudrais exprimer ma plus sincère reconnaissance à Mr Thierry MAUGARD, Professeur de l'Université de La Rochelle, mon directeur de thèse et à Mr Nicolas BRIDIAU, mon encadrant scientifique au laboratoire LIENSs, d'avoir dirigé ce doctorat. Je les remercie pour leur soutien, leur rigueur scientifique et leur accessibilité.

Je remercie également chaleureusement Mr Stanislas BAUDOUIN et Mme Delphine DUFOUR, d'avoir encadré la partie industrielle de ces travaux à SEPROSYS. Je les remercie pour leur accessibilité, leur confiance et leur soutien. Ils ont toujours fait en sorte que je me sente bien dans leur entreprise et pour ça je ne les remercierai jamais assez.

J'aimerais également remercier l'ensemble du personnel de SEPROSYS, Joaquim, Fanny, Christophe et Alison pour leur gentillesse et leur aide. Je pense en particulier à Joaquim qui a toujours été là avec une bonne humeur communicative quand j'avais besoin d'aide sur la partie extraction.

J'ai une pensée particulière pour deux de mes anciens encadrants de stage, Garry et Bruno, deux scientifiques passionnants qui m'ont transmis leur goût pour la recherche avec patience, enthousiasme et savoir scientifique. Ils ont tous deux, peut-être sans le savoir, pris part à mon envie de continuer dans ce domaine.

Je souhaiterais remercier Mr Antoine BONNET, mon collègue et ami, toujours de bon conseil sur la partie chimie analytique, même si je sais qu'il aurait préféré que je travaille sur autre chose que ces polysaccharides !

Je remercie mes collègues ou anciens collègues Nicolas JOGUET, Ibtissem DOGHRI, Florence BRIAN-JAISSON et Mariem LAAMARI pour leur bonne humeur et pour tous les bons moments passés ensemble. Et bien sûr je ne peux pas oublier Valérie SOPENA, alias Mamicrobio et Camille JUIN, mes deux acolytes de shopping du midi. Merci pour votre présence, dans les moments de joie comme dans les moments plus difficiles, ces années n'auraient pas été les mêmes sans vous !

Je remercie mes camarades de bureau, les anciens Rachida ACHOUR et Oussama ACHOUR alias LE PRESIDENT, deux personnes exceptionnelles qui auront marqué mon début de thèse

et le nouveau, Hugo GROULT, ne t'inquiète pas, je suis certaine que tes blagues s'amélioreront avec un peu d'entraînement !

Je ne peux remercier mes camarades de bureau sans penser aux deux qui m'ont supportée le plus longtemps ; Nicolas POUPARD poupinette, avec son sens de l'humour très subtil (Tu me racontes une blaaaague !?) et Benjamin LE BRIS deloin qui parle de lui à la troisième personne (non, ON n'a pas dit... !). Malgré leurs évidents problèmes de vue en ce qui concerne les couleurs, je voudrais les remercier sincèrement pour tous les moments que nous avons passés ensemble, devant le rugby (avec Antoine !), sur les terrasses ou même le midi avec toutes ces conversations scientifiques stimulantes (ou parfois un peu moins scientifiques). Je suis même prête à remercier Nicolas pour la magnifique programmation musicale du labo.

Je souhaiterais également remercier tous les chercheurs, ingénieurs, techniciens, stagiaires ou personnel administratif que j'ai pu cotoyer lors de ces trois années. Je pense en particulier à Viviane BIOU et Laetitia DARRE qui ont toujours été là pour moi dans la gestion de mon quotidien administratif, toujours avec le sourire et la bonne humeur. Je remercie également les stagiaires qui ont participé à ce projet ; Inès, Jérémy, Justine, Rémi, Marine et Iago.

Pour finir je tiens à remercier très sincèrement tout mon entourage, mes amis de La Rochelle ou d'ailleurs, mes anciennes colloc' et ma famille pour leur soutien et leur présence. Ils ont tous une part dans ce que je suis aujourd'hui. Je pense notamment à mes grand-parents et particulièrement à ma grand-mère qui n'aura pas vu l'aboutissement de ce travail mais qui je le sais aurait été fière. Un immense merci à mes parents et ma sœur préférée Gaëlle qui ont toujours cru en moi et m'ont soutenu dans mes choix malgré l'éloignement. Je ne serais certainement pas là où je suis aujourd'hui sans eux. Merci pour tout !

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES	9
INDEX DES TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES UNITES	11
I. INTRODUCTION GENERALE.....	14
II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
<i>I.1. LES MACROALGUES</i>	<i>22</i>
<i>1.1.1. La phylogénie et classification des macroalgues.....</i>	<i>22</i>
<i>1.1.2. La morphologie des macroalgues.....</i>	<i>23</i>
<i>1.1.6. Les polymères de macroalgues.....</i>	<i>24</i>
I.1.1.1. Les protéines	24
I.1.1.1.a. Le profil des protéines de macroalgues	24
I.1.1.1.b. Les méthodes classiques d'extraction et de purification	25
I.1.1.2. Les polysaccharides des macroalgues.....	26
I.1.1.2.a. Le profil des différents polysaccharides de macroalgues.....	26
I.1.1.2.b. Les méthodes d'extraction des polysaccharides sulfatés des macroalgues	32
<i>1.1.3. L'industrie des macroalgues.....</i>	<i>34</i>
I.1.3.1. Les macroalgues dans le domaine de l'alimentation humaine.....	35
I.1.3.2. Les macroalgues dans l'industrie des colloïdes.....	37
I.1.3.3. Autres usages industriels des macroalgues.....	38
<i>1.1.5. Les macroalgues, sources de composés bioactifs.....</i>	<i>38</i>
<i>I.2. PROCESSUS DE COAGULATION ET ANTI-COAGULANTS</i>	<i>39</i>
<i>1.2.1. Physiologie de la coagulation</i>	<i>39</i>
I.2.1.1. Le système hémostatique	39
I.2.1.2. Le processus de coagulation.....	39
I.2.1.2.a. Première conception du phénomène de coagulation	40
I.2.1.2.b. Conception actuelle de la coagulation : la voie cellulaire.....	41
<i>1.2.2. Les traitements anti-coagulants actuels</i>	<i>45</i>
I.2.2.1. Les premiers anti-coagulants : une utilisation toujours majoritaire.....	46
I.2.2.1. a. Les héparines et dérivés	46
I.2.2.1. b. Les antivitamines K (AVK)	49
I.2.2.2. Nouveaux anti-coagulants développés depuis le début des années 2000	50
I.2.2.2.a. Les inhibiteurs du facteur Xa	50
I.2.2.2.b. Les inhibiteurs de la thrombine (facteur IIa)	52
<i>1.2.3. Le marché des anticoagulants.....</i>	<i>53</i>
I.2.3.1. Marché international.....	53
I.2.3.2. Le marché français	54
<i>1.2.4. Les polysaccharides de macroalgues, de nouvelles sources d'anticoagulants ?.....</i>	<i>54</i>
I.2.4.1. Les différentes sources de polysaccharides sulfatés.....	54
I.2.4.2. L'intérêt des polysaccharides de macroalgues comme anti-coagulants	55
<i>I.3. L'ACTIVITE DERMO-COSMETIQUE « ANTI-AGE »</i>	<i>58</i>
<i>1.3.1. L'histologie de la peau</i>	<i>58</i>
I.3.1.1. L'épiderme.....	58
I.3.1.2. Le derme	60
I.3.1.2.a. Organisation du derme	60
I.3.1.2.b. Cellules constitutives du derme	61
I.3.1.2.c. La matrice extracellulaire.....	63

1.3.2. <i>Le vieillissement cutané</i>	67
1.3.2.1. Le vieillissement intrinsèque	67
1.3.2.1.a. Le raccourcissement des télomères	67
1.3.2.1.b. Les facteurs hormonaux	67
1.3.2.1.c. La sénescence cellulaire	68
1.3.2.1.d. Le stress oxydatif.....	69
1.3.2.2. Le vieillissement extrinsèque	69
1.3.2.2.a. Le photovieillissement.....	69
1.3.2.2.b. Le tabagisme.....	71
1.3.2.2.c. La pollution atmosphérique.....	71
1.3.2.3. Les modifications liées au vieillissement cutané	72
1.3.3. <i>Les macroalgues, source de cosmétiques anti-âge ?</i>	73
1.3.3.1. Le marché mondial des cosmétiques et dermo-cosmétiques	73
1.3.3.2. Un besoin accru pour des produits naturels	74
1.3.3.2. Les macroalgues, source de molécules anti-âge.....	75
III. RESULTATS	80
PARTIE A : ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-COAGULANTE D'EXTRAITS AQUEUX DE MACROALGUES	82
A.1. <i>Introduction</i>	84
A.2. <i>Evaluation de l'activité anti-coagulante d'extraits aqueux de macroalgues comestibles françaises</i>	86
A.3. <i>Production pilote de polysaccharides sulfatés purifiés, évaluation de leur activité anti-coagulante et impact de la sulfatation sur l'activité des ulvanes</i>	100
A.3.1. Production de polysaccharides sulfatés purifiés et évaluation de leur activité anti-coagulante.....	100
A.3.2. Effet de la sulfatation sur l'activité anti-coagulante d'ulvanes extraits d'Ulva sp.	108
A.4. <i>Discussion générale</i>	131
PARTIE B : EVALUATION DE L'ACTIVITE DERMO-COSMETIQUE ANTI-AGE D'EXTRAITS DE MACROALGUES .	144
B.1. <i>Introduction générale</i>	146
B.2. <i>Effet stimulant d'extraits aqueux de macroalgues sur la production de collagène in vitro par des fibroblastes dermiques humain</i>	149
B.3. <i>Production-pilote d'ulvanes de différents poids moléculaires extraits d'Ulva sp. et leurs effets sur la biosynthèse de collagène et d'acide hyaluronique par des fibroblastes dermiques humains</i>	163
B.4. <i>Discussion générale</i>	176
IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	184
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	194

Index des Figures

<i>Figure 1 : Place des trois grandes classes de macroalgues dans l'arbre phylogénétique des êtres vivants</i>	22
<i>Figure 2 : Grands types de morphologies de thalles de macroalgues</i>	23
<i>Figure 3 : Structure schématique de la paroi cellulaire d'une macroalgue brune de l'ordre des Fucales (A), d'une macroalgue rouge de l'ordre des Gigartinales (B) et d'une macroalgue verte de l'ordre des Ulvales (C)</i>	27
<i>Figure 4 : Unités disaccharidiques répétées des différents types de carraghénanes et leur transformation par traitement basique</i>	29
<i>Figure 5 : Structure moléculaire de l'alginate</i>	30
<i>Figure 6 : Premières structures reportées pour les fucoïdanes de Fucus vesiculosus par Percival (A) et Patankar (B)</i>	30
<i>Figure 7 : (a) Unités répétitives majoritaires des ulvanes et (b) Variation possible de structure de l'unité disaccharidique</i>	31
<i>Figure 8 : (A) Production mondiale de macroalgues entre 1952 et 2012 et (B) Evolution de la collecte et culture de macroalgues dans le monde depuis 1970</i>	34
<i>Figure 9 : Répartition de l'utilisation industrielle des macroalgues dans le monde et en Europe (CEVA)</i>	35
<i>Figure 10 : Répartition de la production mondiale de macroalgues en 2009</i>	35
<i>Figure 11 : Cascade de la coagulation dans sa représentation classique</i>	40
<i>Figure 12 : Unité répétitive majoritaire de l'héparine</i>	46
<i>Figure 13 : Action de la séquence pentasaccharidique spécifique de l'HNF sur l'inhibition de l'activité anti Xa ATIII-dépendante</i>	46
<i>Figure 14 : Influence de la longueur de la chaîne polysaccharidique de l'héparine sur son activité inhibitrice des facteurs Xa et IIa</i>	47
<i>Figure 15 : Préparation des HBPM par dépolymérisation enzymatique et chimique</i>	48
<i>Figure 16 : Séquence pentasaccharidique du fondaparinux</i>	50
<i>Figure 17 : Structure de l'apixaban (A) et du rivaroxaban (B)</i>	52
<i>Figure 18 : Evolution annuelle des ventes d'anticoagulants injectables et oraux en nombre de DDJ</i> .	54
<i>Figure 19 : Schéma des différentes couches de la peau</i>	58
<i>Figure 20 : Schéma en coupe de l'épiderme et de ses constituants</i>	59
<i>Figure 21 : Observation microscopique de fibroblastes de la peau humaine</i>	62

<i>Figure 22 : Biochimie de la substance fondamentale</i>	65
<i>Figure 23 : Structure de l'acide hyaluronique</i>	66
<i>Figure 24 : Évolution des sillons primaires de la peau avec l'âge, mesurés grâce aux techniques de la tribologie</i>	72
<i>Figure 25 : Espèces d'algues étudiées dans la partie A.1.</i>	85
<i>Figure 26 : Analyse TCA des extraits aqueux et SEPROSYS de Laminaria digitata et Ulva sp</i>	104
<i>Figure 27 : Analyse TT des extraits aqueux et SEPROSYS® ULVAN-01 et LAMI-01</i>	105
<i>Figure 28 : Evolution de l'activité anti-coagulante mesurée par coagulométrie de ULVAN-01 au cours de sa dépolymérisation par résine d'échange d'ion</i>	135
<i>Figure 29 : Disaccharides d'ULVAN-02 identifiés par UHPLC-MS/MS sulfatés une fois (A), deux fois (B), trois fois (C) ou quatre fois (D) et exemple d'enchaînement oligosaccharidiques présents dans ULVAN-02 (E)</i>	137
<i>Figure 30 : Représentation symbolique de fragments oligosaccharidiques identifiés pour un ulvane sulfaté à la hauteur de 20%, naturel (A) et sulfaté par sulfatation chimique (B)</i>	140
<i>Figure 31 : Espèces de macroalgues étudiées dans la partie B.1</i>	147
<i>Figure 32. Culture in vitro de fibroblastes dermiques humains avant (gauche) et après (droite) coloration du collagène au Sirius Red</i>	176

Index des tableaux

<i>Tableau I : Teneur en protéines de différentes macroalgues vertes, rouges et brunes</i>	25
<i>Tableau II : Teneur en polysaccharides totaux et en fibres structurales et alimentaires d'espèces importantes de macroalgues dans le nord-ouest de l'Europe</i>	26
<i>Tableau III : Espèces de macroalgues comestibles</i>	36
<i>Tableau IV : Production mondiale de phycocolloïdes</i>	37
<i>Tableau V : Les facteurs de la coagulation</i>	42
<i>Tableau VI : Applications cosmétiques de composés dérivés d'algues</i>	78
<i>Tableau VII Caractérisation biochimique des extraits SEPROSYS®</i>	103
<i>Tableau VIII : Activité anti-coagulante d'ULVAN-01 et LAMI-01 : comparaison avec les extraits aqueux et commerciaux</i>	105
<i>Tableau IX : Activité anticoagulante des extraits aqueux de macroalgues</i>	131
<i>Tableau X : Activité anti-coagulante de ULVAN-01 et ULVAN-02</i>	139

Liste des abréviations et des unités

Abbréviations:

ADN	Acide désoxyribonucléique
AnGal	3,6-anhydro- α -galactopyranose
ANSM	Agence nationale de la sécurité du médicament et des produits de santé
AOD	Anticoagulants oraux directs
AP-1	Activator protein 1
APTT	Activated partial thrombin time
ARN	Acide ribonucléique
ATIII	Antithrombine
AVC	Accident vasculaire cérébral
AVK	Anti-vitamine K
CDD	Cellule dendritique dermale
CPP	Collagen Potentiating Peptide
DDJ	Dose définie journalière
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamide
DP	Degré de polymérisation
ECF-A	Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis
ECM	Extracellular matrix
EPS	Exopolysaccharide
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
FAO	Food and Administration organization of the United Nations
FLP	Fibrillin-like protein
FT	Facteur tissulaire
GAG	Glycosaminoglycane
GH	Growth hormone
GlcA	Acide β -D-glucuronique
GlcN	D-glucosamine
GlcNAc	N-acetyl-d-glucosamine
HA	Hyaluronan or Hyaluronic acid
HBPM	Héparine de bas poids moléculaire
HCII	Héparin cofacteur II
HIT	Héparin-induced thrombocytopenia
HNF	Héparine non fractionnée
HPLC	High pressure liquid chromatography
IdoA	Acide α -L-iduronique
LMW	Low molecular weight
LMWH	Low molecular weight heparin

LTBP-2	Latent transforming growth factor beta binding protein 2
MAA	Mycosporine-like amino acid
MAGP	Microfibril associated glycoprotein
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Matrix metalloproteinase
MW	Molecular Weight
NACO	Nouveaux anticoagulants oraux
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHDF	Normal human dermal fibroblast
NPK	Azote, Phosphore, Potassium
Oméga-3 EPA	Oméga-3 Eicosapentaenoic acid
PAF	Platelet-activating factor
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Protéine C
PS	Protéine S
PT	Prothrombin time
RID	Refractive index detector
ROS	Reactive oxygen specie
RT	Room temperature
SOD	Superoxyde dismutase
TAFI	Thrombin-activated fibrinolysis inhibitor
TCA	Temps de céphaline activée
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGF- β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TM	Thrombomoduline
TP	Temps de prothrombine
TT	Temps de thrombine ou thrombin time
UFH	Unfractionned heparin
UV	Ultraviolet

Unités:

%	Pourcentage
BV	Base volume
°C	Degré Celsius
Da	Dalton
h	Heure
g	Gramme
L	Litre
M	Mole
Min	Minute
rpm	Rotation par minutes
s	Seconde

I. Introduction générale

Introduction générale

Cette thèse CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche) a été réalisée au sein de l'équipe AMES (Approches Moléculaires, Environnement-Santé) de l'UMR7266 CNRS-LIENSs de l'Université de La Rochelle et de l'entreprise SEPROSYS, située à La Rochelle.

En 2014, le marché des macroalgues représente 21 millions de tonnes fraîches (FAO 2014), dont 94% sont issues de l'aquaculture, pour seulement 6% issues de la collecte de macroalgues sauvages (Buchholz, Krause, et Buck 2012). Entre 1995 et 2012, la production mondiale de macroalgues a augmenté de plus de 176% ; cependant, cette augmentation est due au fort accroissement de la production de Phaeophycées (macroalgues brunes) et l'explosion de la production de Rhodophycées (macroalgues rouges) (FAO 2014). Au contraire, la production de Chlorophycées (macroalgues vertes) est constante depuis les années 50 et est ultra-minoritaire. Au niveau mondial, les macroalgues sont majoritairement utilisées comme légumes avec trois macroalgues représentant 99% de la demande mondiale : les macroalgues rouges de l'espèce *Porphyra* et les macroalgues brunes *Laminaria japonica* et *Undaria pinnatifida*. A l'échelle européenne, 75% des macroalgues utilisées le sont dans l'industrie des colloïdes avec la production d'agars et d'alginate extraits de macroalgues brunes et les carraghénanes extraits de macroalgues rouges.

Bien que leur utilisation industrielle soit toujours limitée, les macroalgues possèdent une grande variété de molécules d'intérêt qui ont démontré un certain nombre d'activités biologiques comme des protéines, polysaccharides, vitamines, pigments, polyphénols... (Lahaye 1991; Mabeau et Fleurence 1993; Fleurence 1999). Elles comportent en particulier une catégorie de biomolécules originales, les polysaccharides sulfatés, qui sont à l'origine de nombre de leurs activités biologiques comme leurs propriétés anticoagulantes (Carlucci et al. 1997; Chevolut et al. 1999; Matsubara 2004; Majdoub et al. 2009; Jin et al. 2013; Kim et Wijesekara 2011), immuno-inflammatoires (Granert et al. 1994; Jiao et al. 2011; Mohamed, Hashim, et Rahman 2012), antivirales (Damonte, Matulewicz, et Cerezo 2004; Jiao et al. 2011; Pujol et al. 2012; Rabanal et al. 2014; Witvrouw et De Clercq 1997) ou anti-oxydantes (Pilar Rupérez, Ahrazem, et Leal 2002; Rocha de Souza et al. 2007; Costa et al. 2010) qui peuvent-être valorisées dans les domaines des nutraceutiques, pharmaceutiques ou cosmétiques.

SEPROSYS (Séparations Procédés Systèmes) est une société de La Rochelle spécialisée dans le développement de solutions d'extractions et de séparations de molécules. Au cours de l'année 2011, l'entreprise développe un procédé de séparation et de purification fractionnée de biomolécules issues de macroalgues vertes. Ce procédé fait l'objet d'un brevet français, accepté en 2015 avec pour identifiant FR2998894 (B1). Ce procédé innovant de « chimie verte » (dans le sens où il ne fait intervenir ni acide, ni solvant) a pour objectif de valoriser une biomasse jusqu'ici peu exploitée au niveau industriel : les macroalgues vertes (par exemple les macroalgues de type *Ulva sp.*). La société SEPROSYS et le laboratoire LIENSs ont alors élaboré un projet de thèse ayant pour finalité la valorisation de ce procédé d'extraction et de purification par l'étude des activités biologiques potentielles de la fraction polysaccharidique de macroalgues marines.

Introduction générale

Les héparines sont des polysaccharides sulfatés extraits de muqueuses de mammifères (extraits d'intestins de porcs en majorité ou de poumon de bœuf) et sont aujourd'hui les molécules les plus utilisées dans la prévention et le traitement des maladies thromboemboliques. Malgré leur activité anticoagulante majeure (Mulloy, Hogwood, et Gray 2010), l'héparine peut être à l'origine d'effets secondaires graves comme des thrombocytopenies (Warkentin et al. 1995) ou des hémorragies (Da Silva et Sobel 2002). De plus, sa faible biodisponibilité (Emanuele et Fareed 1987) en fait un traitement très cher. Afin de réduire les risques liés aux traitements hépariniques, l'héparine peut être dépolymérisée en molécules de tailles plus petites, appelées Héparines de Bas Poids Moléculaires (HBPM). Même si les HBPM réduisent fortement les risques de pathologies associées à ce type de traitement anti-coagulant, les risques sont toujours très importants et les coûts de production de ces molécules sont très élevés. Ainsi, étant donné les risques et le coût de ces traitements, il existe un vrai besoin de trouver de nouvelles sources d'anti-coagulants. L'évaluation de l'activité anti-coagulante potentielle d'extraits aqueux de macroalgues riches en polysaccharides sulfatés avec différents degrés de pureté fera l'objet de la partie III.A de cette thèse.

Selon des prévisions d'une étude réalisée en décembre 2015, il est estimé que le marché des cosméceutiques représentera 61 milliards de dollars d'ici 2020. La forte croissance de ce marché est principalement motivée par la demande grandissante des consommateurs pour des produits permettant de maintenir une peau en bonne santé sans utiliser de produits chimiques. Dans ce contexte, la diversité biologique et biochimique des macroalgues représente également une source très prometteuse de nouveaux produits cosméceutiques naturels. Aujourd'hui, les macroalgues sont utilisées dans l'industrie cosmétique majoritairement comme additifs (agents texturants, colorants...) mais également directement comme agents actifs pour leurs activités de photo-protection, anti-oxydante, de dépigmentation ou blanchiment, activité anti-inflammatoire, anti-âge, hydratante, anti-microbienne...(Thomas et Kim 2013; Bedoux et al. 2014). L'effet des extraits aqueux de macroalgues sur des fibroblastes dermiques humains, et en particulier sur leur production de collagène et d'acide hyaluronique, deux molécules de la matrice extracellulaire essentielles aux propriétés biomécaniques de la peau, sera évalué dans la partie III.B. de cette thèse.

Les premiers tests de l'entreprise ont été réalisés sur une matière première originaire de l'île d'Oléron. En effet, l'entreprise est fournie en macroalgues vertes de type *Ulva sp.* par une ferme aquacole, située sur la côte nord-est de l'île d'Oléron sur des anciens marais ostréicoles, la ferme du Douhet. Cette ferme marine est l'une des plus grandes éclosiers de production d'alevins de daurade royale (*Sparus aurata*) d'Europe mais a également diversifié son activité, à une échelle beaucoup plus réduite, en utilisant des bassins de lagunage pour la culture d'algues marines. Au cours de la thèse et des résultats obtenus, le procédé mis en place à SEPROSYS a été adapté à la purification de polysaccharides sulfatés d'autres genres de macroalgues. Ainsi, l'étude a été étendue à ces autres macroalgues afin de comparer leurs activités biologiques avec celles d'*Ulva sp.* de l'île d'Oléron. Le choix des macroalgues a été opéré en fonction de différents critères comme l'accessibilité de la biomasse en France et en particulier sur la côte atlantique, son prix et le fait qu'elles soient comestibles. Ce dernier

critère de comestibilité est intéressant car cela présuppose que les macroalgues ont déjà fait l'objet de nombreux tests, notamment sur leur possible toxicité, et que leur utilisation à des fins commerciales est donc acceptée.

Ce travail de thèse s'articule en trois grandes parties :

- Une étude bibliographique (II) où nous décrivons, tout d'abord, la diversité des molécules extraites de macroalgues avec un focus sur les fractions polymériques (en particulier les protéines et polysaccharides) ainsi que le marché actuel des macroalgues et de ses dérivés. Par la suite, nous présenterons les connaissances actuelles sur le processus de coagulation, les traitements anticoagulants commerciaux sur le marché et le potentiel des macroalgues comme une nouvelle source de molécules anticoagulantes. Dans la dernière partie, nous décrivons l'effet du vieillissement sur la peau, en particulier sur les composants de la matrice extracellulaire (MEC) du derme ainsi que les molécules extraites de macroalgues qui ont démontré un intérêt pour des applications dermo-cosmétiques et en particulier, des applications « anti-âge ».

A la suite de cette bibliographie, les principaux résultats de la thèse seront exposés en deux grandes parties constituées de publications en review ou en préparation.

- La première grande partie (III.A) concernera l'évaluation du potentiel de fractions de macroalgues sur l'activité anticoagulante *in vitro*. Celle-ci sera divisée en deux chapitres.
 - 1) Le premier chapitre (III.A.1) concernera le screening d'une dizaine de macroalgues pour leur potentiel en tant qu'anticoagulants. Pour cela, les algues seront soumises à une extraction aqueuse simple, rapide et peu coûteuse permettant de récupérer, entre autres, la majeure partie des polysaccharides sulfatés, qui est la fraction qui nous intéresse pour l'activité anticoagulante. Les extraits aqueux seront ensuite testés pour leur activité anticoagulante par des tests enzymatiques, ciblant les deux enzymes centrales de la coagulation, le facteur Xa et la thrombine (facteur IIa), ainsi que par des essais de coagulométrie permettant de tester l'activité sur les trois voies principales de la coagulation *in vitro*. Les résultats seront comparés à l'activité de deux anticoagulants commerciaux : l'héparine non fractionnée (HNF) et le Lovenox[®], une héparine de bas poids moléculaire (HBPM).
 - 2) Dans le deuxième chapitre (III.A.2), nous appliquerons le procédé SEPROSYS[®] afin d'extraire les polysaccharides sulfatés d'*Ulva sp.* de l'île d'Oléron, ainsi que des macroalgues présentant le meilleur potentiel anticoagulant de chaque grande classe d'algue (brune, verte, rouge). Les productions pilotes de polysaccharides seront ensuite testées pour leur potentiel anticoagulant. Dans la dernière partie de ce chapitre, nous nous intéresserons à l'impact de certaines modifications structurales sur l'activité anticoagulante des ulvanes (et en particulier la sulfatation).
- La deuxième grande partie (III.B) concernera l'évaluation du potentiel « anti-âge » des extraits de macroalgues sur la production de collagène et d'acide hyaluronique de fibroblastes dermiques humains normaux.

Introduction générale

Comme dans la partie sur les anticoagulants, ce chapitre sera divisé en deux parties, avec,

- 1) Dans la première partie (III.B.1) l'évaluation du potentiel « anti-âge » des différents extraits aqueux de macroalgues. Dans cette partie, nous réaliserons également une séparation des fractions polysaccharidiques et des fractions protéiques des extraits aqueux présentant des résultats intéressants afin de savoir quelle(s) fraction(s) est à l'origine de l'activité observée.
- 2) Dans la deuxième partie du chapitre (III.B.2), nous présenterons les résultats d'une étude sur l'impact de la dépolymérisation des ulvanes extraits par le procédé SEPROSYS[®] sur la production d'acide hyaluronique par des fibroblastes dermiques humains.

Enfin, les travaux seront discutés dans le contexte global de la valorisation du procédé développé par SEPROSYS et les perspectives envisagées pour la suite du projet seront décrites.

Finalement, l'objectif majeur de cette thèse sera d'identifier des applications potentiellement commercialisables pour les polysaccharides sulfatés de macroalgues marines extraits et purifiés selon le procédé développé par la société SEPROSYS. Il sera intéressant de cibler des activités diverses qui appartiennent au domaine de la pharmacutique, où les molécules identifiées sont à haute valeur ajoutée mais qui représentent un risque important d'un point de vue économique mais aussi au domaine de la dermo-cosmétique pour lequel les molécules sont à valeur ajoutée moyenne mais où le risque est plus faible et le retour sur investissement plus rapide.

II. Etude bibliographique

I.1. Les macroalgues

Le terme macroalgue englobe tous les organismes aquatiques d'eau douce ou marins ainsi que de certains milieux terrestres. Ces organismes sont considérés comme primitifs dans le sens où ils ont émergé il y a plus d'un milliard d'années en lignées évolutives indépendantes, bien avant l'apparition des végétaux verts terrestres. Ce sont des organismes **eucaryotes photosynthétiques pluricellulaires**. Le terme de macroalgue regroupe 20 à 30 000 espèces dans le monde, soit 18% du règne végétal mais n'a pas de valeur taxonomique (Radmer et Parker 1994).

I.1.1. La phylogénie et classification des macroalgues

Les macroalgues peuvent-être retrouvées dans **plusieurs lignées évolutives indépendantes** y compris à la base de la lignée des plantes terrestres qui ont pour ancêtre une algue verte. D'après la phylogénie nucléaire des eucaryotes, les algues vertes et rouges partagent un ancêtre commun. Les algues brunes résultent d'une endosymbiose secondaire impliquant une algue rouge, à l'origine du plaste des algues brunes. Les trois grandes lignées de macroalgues sont donc le résultat d'une histoire évolutive très complexe (Person 2011) (Figure 1).

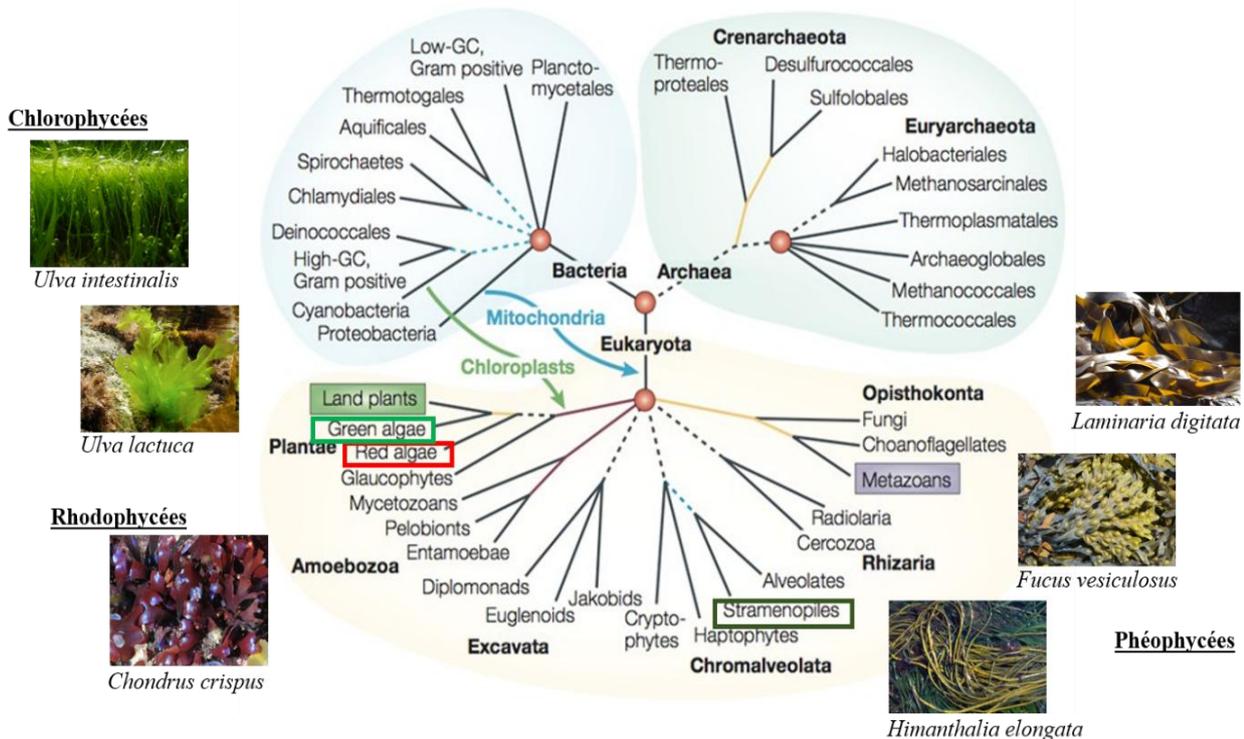


Figure 1 : Place des trois grandes classes de macroalgues dans l'arbre phylogénétique des êtres vivants, d'après (photos : seaweed.ie et thalgo.ie)

Les macroalgues possèdent des **chlorophylles** ainsi que des **pigments** additionnels jaunes, rouges ou bleu, qui ont permis de les classer en trois groupes différents ou « lignées»: les **macroalgues vertes** (Chlorophycées) qui possèdent des chlorophylles de type a et b, les **macroalgues rouges** (Rhodophycées) présentant de la chlorophylle a et des phycobilines rouges (phycoérythrine) et bleues (phycocyanine) et enfin les **macroalgues brunes**

(Phéophycées) possédant de la chlorophylle c en plus de la chlorophylle a et de fortes teneurs en caroténoïdes (De Reviers 2003).

Les macroalgues présentent une grande diversité structurale, d'un point de vue macroscopique comme microscopique. Cependant, celles-ci peuvent être classées en une **dizaine d'embranchements** (Pérez 1997) en fonction de différents critères comme leurs modes de reproduction, leurs caractéristiques structurales, leurs polysaccharides de réserve ou leurs compositions pigmentaires.

I.1.2. La morphologie des macroalgues

Les macroalgues sont des composants essentiels des écosystèmes côtiers, riches d'une très grande diversité génétique et pouvant occuper des milieux très diversifiés. Les trois grandes lignées d'algues pluricellulaires, brunes, rouges et vertes, sont majoritairement présentes en milieu marin, mais certaines familles ont aussi conquis les eaux douces (De Reviers 2003).

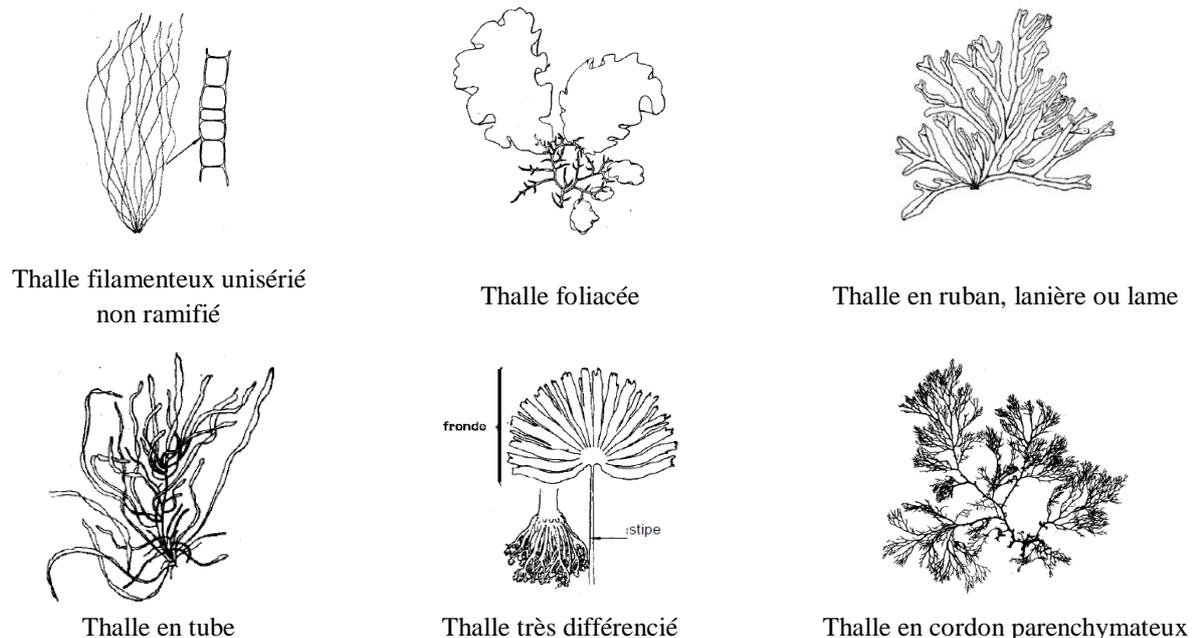


Figure 2 : Grands types de morphologies de thalles de macroalgues, d'après (Fischer et Bauchot 1987)

Il existe une très grande diversité de morphologies chez toutes ces macroalgues, en fonction de la **forme du thalle**, allant du filament unisériel simple (comme *Ectocarpus sp.*), thalle en cordon parenchymateux (comme *Sphaerococcus*), au thalle foliacée (comme *Ulva lactuca*), aux thalles en lanières, ruban ou lame (comme *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus* ou *Ascophyllum nodosum*), en passant par les thalles très différenciés des Laminaires (comme *Laminaria digitata*), ou les tubes creux (comme *Ulva intestinalis*) (Figure 2), mais aussi du **type de ramification** (dichotome, verticillée, alterne ou opposée), de la **base de fixation** ou encore de la **taille et port** des individus (Fischer et Bauchot 1987). Les macroalgues peuvent parfois constituer des couvertures denses et étendues, on parle par exemple de « forêts » de laminaires qui constituent des écosystèmes particulièrement riches et productifs.

La présence d'un substrat (lieu d'ancrage) est très importante pour la croissance de la biomasse algale, qu'il soit naturel ou artificiel. Les thalles sont pour la plupart fixés au substrat par des rhizoïdes, un disque basal ou encore un crampon, afin de résister aux contraintes hydrodynamiques du milieu.

Les algues des côtes rocheuses sont fixées par des crampons robustes aux rochers ou aux galets jusqu'à une profondeur de 50 à 75 mètres, même si, au-delà de 30 mètres, leur présence se raréfie, les radiations utiles à la photosynthèse étant absorbées par l'eau de mer. On peut trouver cependant, à des profondeurs jusqu'à 50 mètres, certaines espèces géantes de laminaires (Person 2011).

Les espèces de macroalgues se répartissent sur l'estran en fonction différents facteurs environnementaux comme la durée moyenne d'émergence qui se traduit par des variations d'intensité lumineuse, de salinité ou de température (Creis 2015).

I.1.6. Les polymères de macroalgues

I.1.1.1. Les protéines

I.1.1.1.a. Le profil des protéines de macroalgues

Le contenu en protéines des macroalgues varie significativement d'une espèce à l'autre (tableau I), de 3 à 47% (Harnedy et FitzGerald 2011). De manière générale, ce sont les Rhodophycées qui contiennent les quantités les plus élevées en protéines (jusqu'à 47%) comparées aux Phaeophycées (3 à 15%) et Chlorophycées (9 à 26%) (Fleurence 2004).

Les facteurs environnementaux, et en particulier la saisonnalité influencent le contenu des protéines chez les espèces de macroalgues (Fleurence 1999; Rouxel et al. 2001; Marinho-Soriano et al. 2006). Par exemple, chez *Palmaria palmata*, les valeurs protéiques les plus élevées se trouvent pendant la période hiver-début de printemps et les plus faibles en été-début de l'automne (Galland-Irmouli et al. 1999; Rouxel et al. 2001; Martínez et Rico 2002; Rødde et al. 2004).

Bien que la structure et les propriétés biologiques des protéines d'algues ne soient toujours que peu documentées, la composition en acides aminés de plusieurs espèces de macroalgues est connue. Les algues brunes contiennent en général des quantités plus élevées d'acides aminés que les macroalgues vertes et rouges. Chez *Fucus* sp., *Laminaria digitata* et *Ascophyllum nodosum*, les quantités combinées de ces acides aminés varient de 18% à 44%. Les macroalgues rouges comme *Chondrus crispus* ou *Palmaria palmata* peuvent contenir respectivement jusqu'à 8 et 28,4% de ces acides aminés contre 18 à 42% pour les macroalgues vertes *Ulva* sp. et 13% pour *Ulva pertusa*.

La plupart des macroalgues contiennent tous les acides aminés essentiels et sont une source riche en acide aspartique et acide glutamique (Fleurence 2004). De plus, certaines macroalgues contiennent de grandes quantités d'acides aminés spécifiques comme l'alanine chez *Laminaria digitata*, l'alanine, la glycine, l'arginine, la leucine, la valine, la lycine et la methionine chez *Undaria pinnatifida*, la glycine chez *Palmaria palmata*, l'arginine chez *Chondrus crispus*, la proline chez *Ulva armoricana* ou l'arginine chez *Ulva pertusa*... (Young et al. 1958; Morgan et al. 1980; Fujiwara-Arasaki et al. 1984; Fleurence et al. 1995; Fleurence

1999; Fleurence et al. 1999; Galland-Irmouli et al. 1999; Lourenco et al. 2002; Barbarino et al. 2005; Dawczynski et al. 2007)

Tout comme les protéines, les concentrations de chaque acide aminé varient énormément d'un phylum à l'autre, dans chaque phylum et même d'une espèce à l'autre d'un genre (Harnedy et FitzGerald 2011). De la même façon, les saisons influencent ces concentrations. Ces fluctuations sont liées à de nombreuses variables, certaines concernant par exemple l'apport en nutriments. Ceci est à son tour dépendant de facteurs environnementaux comme la température de l'eau, la lumière, la salinité, le type de protéines présentes et les fluctuations des niveaux en glucides (Morgan et Simpson 1981 a; Morgan et Simpson 1981 b; Galland-Irmouli et al. 1999; Martínez et Rico 2002; Marinho-Soriano et al. 2006).

Tableau I : Teneur en protéines de différentes macroalgues vertes, rouges et brunes (Harnedy et FitzGerald 2011)

Espèce d'algue	Teneur en protéines (%)	Référence	
<i>Chondrus crispus</i>	11-20	(Rupérez et Saura-Calixto 2001; Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Palmaria palmata</i>	8-35	(Morgan, Wright, et Simpson 1980; Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Porphyra umbilicalis</i>	15-37	(Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Porphyra tenera</i>	33-47	(Fleurence 1999; Fleurence 2004)	
<i>Ulva pertusa</i>	17.5-26	(Fleurence 1999; Fleurence 2004)	
<i>Ulva rigida</i>	15-25	(Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Ulva armoricana</i>	18-24	(Fleurence, Chenard, et Luçon 1999)	
<i>Ulva intestinalis</i>	10-18	(Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Fucus vesiculosus</i>	5-10	(Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Himantalia elongata</i>	6-11	(Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Laminaria digitata</i>	8-15	(Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Saccharina latissima</i>	6-11	(Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)	
<i>Undaria pinnatifida</i>	11-24	(Fleurence 2004)	

I.1.1.1.b. Les méthodes classiques d'extraction et de purification

Jusqu'ici, l'extraction et le fractionnement des protéines de macroalgues (ainsi que des peptides et acides aminés) a principalement été développé à l'échelle du laboratoire (Harnedy et FitzGerald 2011). En général les méthodes classiques utilisées pour l'extraction des fractions protéiques macroalgales incluent l'extraction par solvants, l'hydrolyse par enzymes protéolytiques et l'hydrolyse par microorganismes protéolytiques pendant la fermentation (Kim et Wijesekara 2013; Tiwari et Troy 2015).

L'hydrolyse par enzymes protéolytique est généralement préférée par les industries alimentaires ou pharmaceutiques puisque cette technique évite la production de déchets de solvants organiques ou de produits chimiques toxiques, ainsi que la contamination microbienne. De plus, l'hydrolyse par enzymes protéolytiques présente des arguments intéressants comme une efficacité catalytique élevée, une haute spécificité, des conditions de réactions douces et la préservation au maximum de l'efficacité du composé.

L'hydrolyse enzymatique des protéines permet la récupération de fractions protéiques. De plus, des enzymes protéolytiques de plantes, microbes ou animaux peuvent être utilisées pour les procédés d'hydrolyse des protéines marines afin d'obtenir des peptides bioactifs.

Afin de fractionner et purifier les protéines, peptides ou acides aminés bioactifs, différents systèmes ont émergé comme des techniques basées sur le partitionnement aqueux et apolaire et surtout des techniques de chromatographie comme l'échange d'ion, la phase inverse ou la chromatographie en phase gazeuse (Samarakoon et Jeon 2012).

De plus, afin de séparer et récupérer des peptides de masses moléculaires différentes des méthodes d'ultrafiltration ou de chromatographie par gel perméation sont souvent utilisées (Kadam et al. 2015).

I.1.1.2. Les polysaccharides des macroalgues

I.1.1.2.a. Le profil des différents polysaccharides de macroalgues

La proportion de polysaccharides dans les macroalgues est très variable d'une espèce à l'autre avec des concentrations allant de 4% à 76% (tableau II).

Tableau II : Teneur en polysaccharides totaux et en fibres structurales et alimentaires d'espèces importantes de macroalgues dans le nord-ouest de l'Europe (Kraan 2012)

		Algues brunes				Algues vertes		Algues rouges			
		<i>Laminaria et Saccharina</i>	<i>Fucus</i>	<i>Ascophyllum</i>	<i>Undaria</i>	<i>Sargassum</i>	<i>Ulva</i>	<i>Chondrus</i>	<i>Porphyra</i>	<i>Gracilaria</i>	<i>Palmaria</i>
Polysaccharides	Total	38% ^b	62% ^s	42-64% ^s	35-45% ^{d,e}	4% ^f	15-65% ^{g-i,q}	55-66% ^s	40% ^e	36% ^f	38-74% ^j
		48% ^s	66% ^a	44% ^c		68% ^f	18% ^p		41% ^r	62% ^b	50% ^s
		58% ^a		70% ^a			42-46% ^s		50-76% ^s	63% ^f	66% ^k
		51% ^s							54% ^b		
Fibres structurelles et alimentaires	Total	36% ^l			35-46% ^{l,m}	49-62% ^{l,m}	38% ^{l,m}		35-49% ^{l,m}		
	Soluble			38% ^c	30% ^{l,m}	33% ^{l,m}	21% ^{l,m}		18% ^{l,m}		
	Lignine						3% ^g				
	Cellulose	10% ⁿ	2-4,5% ^o	2% ^o			9% ^g				
	Hémicellulose	4,5-9% ^o		3,5-4,6% ⁿ			9% ^g				

a = (Rioux, Turgeon, et Beaulieu 2007), b = (Wen et al. 2006), c = (Tseng 2001), d = (Je et al. 2009), e = (Murata et Nakazoe 2001), f = (Marinho-Soriano et al. 2006), g = (Ventura et Castañón 1998), h = (Ortiz et al. 2006), i = (Sathivel et al. 2008), j = (Heo et Jeon 2008), k = (Mishra et al. 2009), l = (Dawczynski, Schubert, et Jahreis 2007), m = (Lahaye 1991), n = (Horn et al. 2000), o = (Black 1950), p = (Foster et Hodgson 1998), q = (Wong et Cheung 2000), r = (Arasaki et Arasaki 1983), s = (Morrissey, Kraan, et Guiry 2001)

La grande majorité des polysaccharides de macroalgues sont des hétéropolysaccharides. En effet, ils sont constitués d'unités (ramifiées ou non) qui se répètent et qui présentent au moins

Etude bibliographique

deux résidus différents. Ils peuvent également contenir différents substituants liés par des liaisons éthers, esters, amides, sulfates ou acétaliques. Ces groupements sont en grande partie responsables des propriétés physico-chimiques de ces polysaccharides (Percival et McDowell 1967).

Les polysaccharides des macroalgues peuvent-êtré séparés en deux grandes catégories : **les polysaccharides de réserve et les polysaccharides pariétaux**, eux-mêmes subdivisés en **polysaccharides de la phase matricielle et de la phase fibrillaire**.

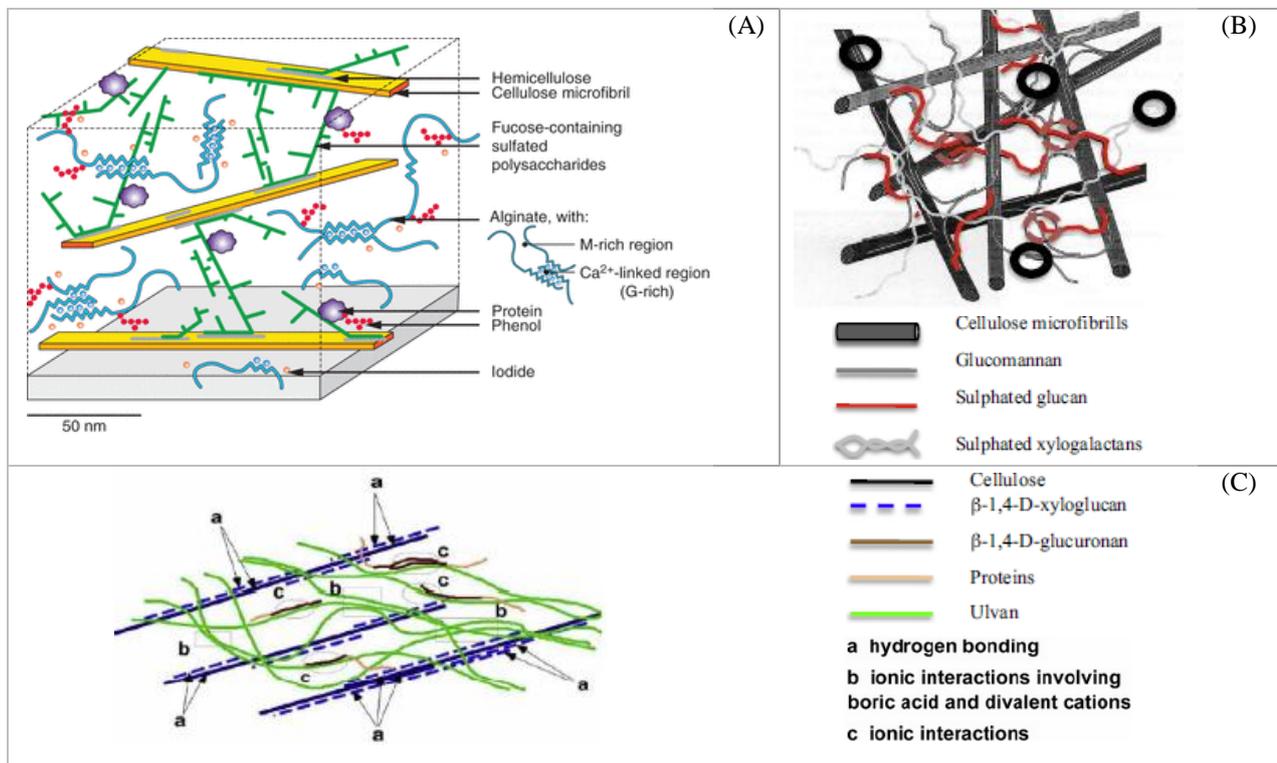


Figure 3 : Structure schématique de la paroi cellulaire d'une macroalgue brune de l'ordre des Fucales (A), d'une macroalgue rouge de l'ordre des Gigartinales (B) et d'une macroalgue verte de l'ordre des Ulvales (C) d'après (Lechat 1998; Lahaye et Robic 2007; Stiger-Pouvreau, Bourgoignon, et Deslandes 2016).

i) Les polysaccharides de réserve

Les polysaccharides de réserves résultent directement de la photosynthèse et sont stockés notamment dans les vacuoles des cellules. Il existe différents polysaccharides de réserves selon l'espèce de macroalgues mais on retrouve en grande majorité de la **laminarine** qui est un polymère de 1,3- β -glucopyranose chez les algues brunes, de l'**amidon floridéen** (c'est-à-dire un amidon qui ne contient pas d'amylose), un polymère de 1,4- α -glucose chez les algues rouges et du **glucane** qui est un polymère de 1,4- β -glucose chez les algues vertes. Les algues brunes possèdent également des polysaccharides de stockage de type **mannitol**, particulièrement chez les espèces *Laminaria* et *Saccharina* (Kraan 2012) les macroalgues rouges des glucides de type **floridoside**, **isofloridoside** ou **digeneaside** (Kremer 1979, 1980).

ii) *Les polysaccharides pariétaux*

La paroi des algues est souvent interprétée comme étant une structure biphasique composée d'une phase fibrillaire squelettique et d'une phase matricielle qui possèdent des compositions biochimiques pouvant être très variables d'une espèce à l'autre (McNeill et al. 1984). Ainsi, la nature chimique des colloïdes produits à la périphérie des cellules algales est l'un des critères de classification des grandes familles d'algues (McCandless 1978).

La phase fibrillaire

La phase fibrillaire, neutre, est constituée d'une phase squelettique composée en particulier de polysaccharides insolubles enrobée d'une matrice amorphe mucilagineuse. Les **xylanes**, les **mannanes** et la **cellulose**, que l'on retrouve sous forme de microfibrilles, sont les trois grands polymères participant à la structuration de la paroi des macroalgues (Kloareg et al. 1988).

- La **cellulose**, polymère de (1,4)- β -glucopyranose est particulièrement présente dans les parois des Chlorophycées. En effet, elle peut composer jusqu'à 70% de la paroi des algues vertes contre moins de 20% pour les Phaeophycées (Kloareg et al. 1988) et même moins de 9% pour les Rhodophycées. Dans la paroi, les chaînes de cellulose sont assemblées en microfibrilles. La cellulose présente dans les parois des macroalgues peut comporter, outre le glucose, d'autres unités osidiques comme le mannose ou le xylose.

- Les **xylanes** squelettiques sont des polymères linéaires composés de β -(1,3)-D-xylose ou de β -(1,4)-D-xylose (Valero et Godin 1992). Les premiers ne sont présents que dans les parois ne contenant pas de cellulose et les seconds sont surtout présents chez les algues vertes ainsi que chez quelques algues rouges (comme *Porphyra* par exemple) (Atkins, Parker, et Preston 1969; Iriki et al. 1960).

- Les **mannanes** sont des polymères linéaires composés de β -(1,4)-D-mannose. Les microfibrilles de mannanes (Kloareg et al. 1988) sont fréquemment retrouvées chez les Rhodophycées, et, en particulier, chez les Bangiophycées (Gretz, Sommerfeld, et Aronson 1982).

La phase matricielle

La phase matricielle des macroalgues est très complexe. Il s'agit d'un mucilage hydrosoluble pouvant parfois être associé à des protéines, et comportant également de l'eau et des enzymes. Seuls certains polysaccharides matriciels ont été complètement caractérisés.

Les polysaccharides matriciels des macroalgues rouges

Les Rhodophycées produisent deux types majeurs de polysaccharides : les **agars** et les **carraghénanes**. Ces polysaccharides sont constitués de galactanes sulfatés. La distinction

entre agars et carraghénanes dépend de leur stéréochimie. En effet, les agars sont composés de galactanes avec des résidus L- α -galactose contre D- α -galactose pour les carraghénanes. Certains groupements hydroxyles de ces galactopyranoses peuvent être remplacés par des groupements sulfates, méthylés, pyruvates voire même substitués par un monosaccharide. Les carraghénanes contiennent toujours plus de groupements sulfates que les agars mais contiennent moins de substituants méthyles (Kloareg et al. 1988; Valero et al. 1992; Usov 1998).

Les carraghénanes sont des **D-galactanes sulfatés** de haut poids moléculaire composés d'unités dissaccharidiques avec une alternance de D-galactopyranose liés en β -(1,3) (unité G) et de galactopyranose lié en α -(1,4) (unité D) ou 3,6-anhydro- α -galactopyranose (unité AnGal) (Knutsen et al. 1994). Les carraghénanes sont en général classés selon leurs caractéristiques structurales, comme par exemple leur motif de sulfatation et la présence ou absence de l'unité AnGal sur les unités D. Il existe au moins 15 structures différentes de carraghénanes (Lahaye 2001). Les plus utilisés en industrie sont les carraghénanes κ , ι et λ (Figure 4) (Jiao et al. 2011).

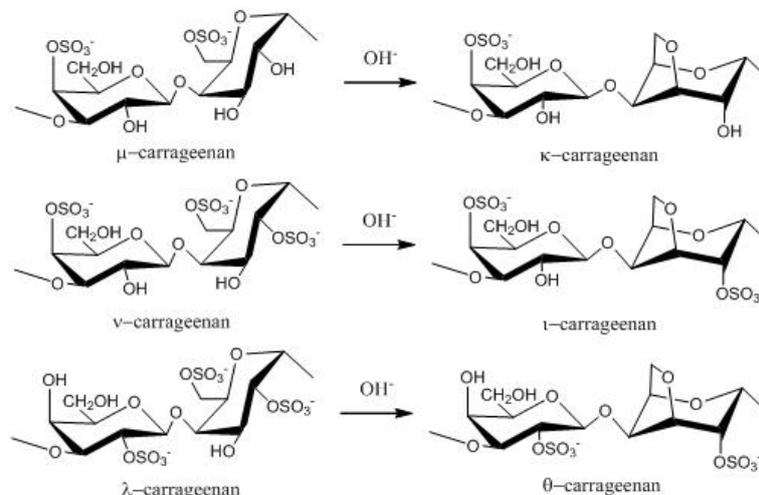


Figure 4 : Unités disaccharidiques répétées des différents types de carraghénanes et leur transformation par traitement basique (Jiao et al. 2011).

En plus des agars et des carraghénanes, certaines macroalgues rouges possèdent un mélange de D et L-galactoses au sein de la même molécule. Ils sont appelés hybrides-DL. Certaines macroalgues rouges possèdent également des xylogalactanes ou xylomannane.

Les polysaccharides matriciels des macroalgues brunes

Les Phaeophycées contiennent deux types majeurs de polysaccharides matriciels : **les alginates et les fucanes**, qui représentent un groupe hétérogène de polysaccharides composé **des fucoïdanes, des ascophyllanes et des sargassanes**.

- **Les alginates** représentent la majeure partie du mucilage matriciel des macroalgues brunes de type Laminaire ou Fucus (entre 10 et 45% du poids sec). Ce sont des polymères linéaires formés de deux monomères, l'acide β -D-mannuronique parfois acétylé et l'acide α -L-guluronique, liés en (1,4). Ils comportent des zones composées uniquement d'acide- α -L-

guluronique (bloc G), de fractions riches en acides- β -D-mannuroniques (bloc M) et de zone où les deux types s'alternent (bloc MG) (Haug, Larsen, et Smidsrød 1974) (Figure 5). Selon l'espèce, l'âge des tissus, l'environnement de récolte..., le rapport M/G et les proportions des trois types de blocs présents peuvent changer.

- **Les ascophyllanes** sont des polysaccharides essentiellement constitués d'acides uroniques comme l'acide mannuronique, l'acide guluronique ou l'acide D-glucuronique identifiés dans les macroalgues du genre *Ascophyllum*. Ils portent des ramifications de type fucose ou xylose (Percival et McDowell 1967; Robert et Catesson 2000).

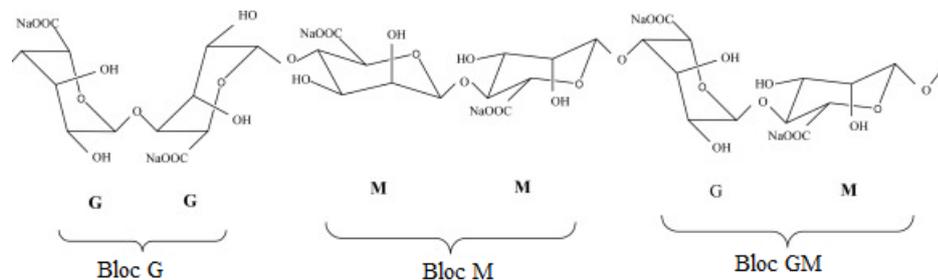


Figure 5 : Structure moléculaire de l'alginate d'après (Daemi, Barikani, et Barmar 2013)

- **Les sargassanes** sont des chaînes linéaires de D-galactose avec des embranchements de L-fucose-3-sulfate ou parfois d'acides uroniques retrouvés dans les algues du genre *Sargassum* (Percival 1968; Medcalf, Schneider, et Barnett 1978; Kloareg, Demarty, et Mabeau 1986)

- **Les fucoïdanes** sont des polysaccharides sulfatés composés d'un squelette de fucose. Ils représentent un groupe de polysaccharides assez hétérogène. Le premier isolé et caractérisé a été le fucoïdane extrait de *Fucus vesiculosus* (Kylin 1913). Ces travaux ont mis en évidence une structure composée de fucopyranoses 4-O-sulfatés liés en (1,2).

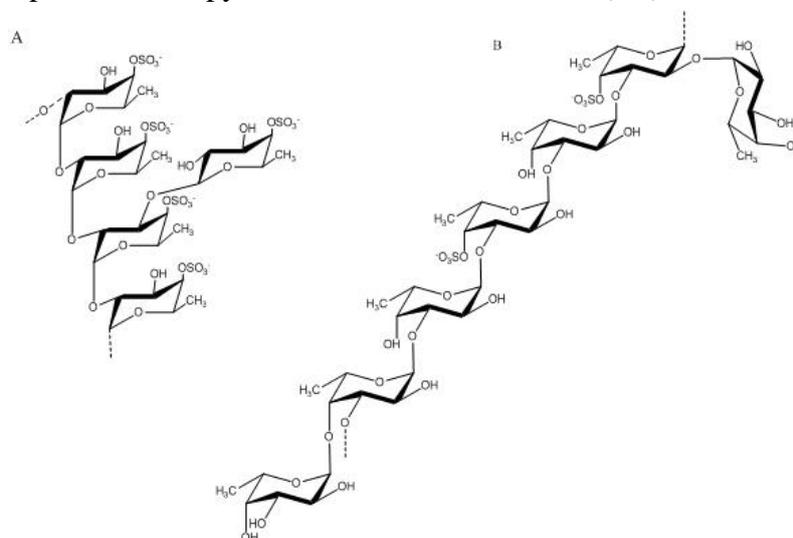


Figure 6 : Premières structures reportées pour les fucoïdanes de *Fucus vesiculosus* par Percival (A) et Patankar (B). (Jiao et al. 2011)

Depuis ces travaux, d'autres études ont identifié divers motifs pour ces fucoïdanes ; des fucoses liés en position 3 et 4-O sulfatés ont été extraits (Patankar et al. 1993), des embranchements ont été observés tous les 2-3 résidus de fucoses. Une étude de 2001 montre que les fucoïdanes extraits de *Fucus vesiculosus* et *Ascophyllum nodosum* contiennent majoritairement un motif disaccharidique contenant des sulfates en position 2 sur les fucoses liés en 3 et des groupements sulfates en positions 2 et 3 sur les fucoses liés en 4 (Chevolot et al. 2001). Les fucanes varient d'une espèce à l'autre et même au sein d'une même espèce. La technique d'extraction peut aussi mener à isoler des formes différentes de fucanes (Li et al. 2008).

Généralement, les fucoïdanes sont divisés en deux groupes (Jiao et al. 2011):

- Les fucoïanes dont la chaîne centrale est composée de L-fucopyranoses liés en α -(1,3), pouvant être extraits de *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata*, *Analipus japonicus*, *Cladosiphon okamuranus* ou *Chorda filum*
- Les fucoïdanes dont la chaîne centrale implique une répétition de L-fucopyranoses liés en α -(1,3) ou (1,4), isolés d'*Ascophyllum nodosum* ou des espèces de *Fucus*.

Il existe néanmoins d'autres types de fucanes plus complexes avec différents embranchements. De nombreux fucanes contiennent également d'autres monosaccharides en quantités moindres comme le glucose, le mannose, le xylose, le galactose, les acides uroniques ou des groupes acétyles.

Les polysaccharides matriciels des algues vertes

Les informations concernant les polysaccharides pariétaux des macroalgues sont bien moins nombreuses que celles des macroalgues rouges et brunes. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette constatation ; une utilisation industrielle bien plus réduite, mais également une grande variabilité de structures.

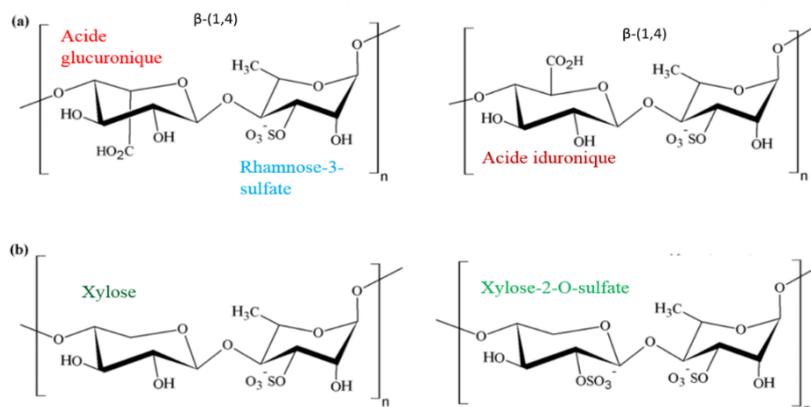


Figure 7 : (a) Unités répétitives majoritaires des ulvanes $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1,4)-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow\text{)]}_n$ et $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Idop-(1,4)-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow\text{)]}_n$ (b) Variation possible de structure de l'unité disaccharidique

Les polysaccharides hydrosolubles majeurs des algues vertes de l'ordre des Ulvales (*Ulva* et *Enteromorpha sp.*) sont les **ulvanes**. Les composés majeurs de ces ulvanes sont le rhamnose (16-45%), les acides iduronique et glucuronique (6-20%), le xylose (2-13%) et le glucose (0,5-9%) (Percival et McDowell 1967; Lahaye et Ray 1996). L'unité disaccharidique

répétée majoritaire des ulvanes est de type acide ulvanobiuronic 3-sulfate contenant soit de l'acide glucuronique (type A), soit de l'acide iduronique (type B) (Figure 7). De plus, des unités contenant du xylose, sulfaté ou non, à la place des acides uroniques branchés en O-2 sur le rhamnose-3-sulfate ont été rapportées chez certaines Ulvales (Lahaye et Ray 1996; Lahaye, Brunel, et Bonnin 1997).

La structure des ulvanes montre toutefois une grande complexité et diversité marquée par les nombreuses unités structurales identifiées chez les différentes espèces d'Ulvales.

Il existe aussi des macroalgues vertes, en particulier de l'espèce *Codium*, contenant des galactanes sulfatés. Ceux-ci sont généralement plus complexes et hétérogènes que ceux retrouvés dans les macroalgues rouges. Les espèces *Codium fragile* et *Codium cylindricum* par exemple contiennent respectivement des arabinogalactanes sulfatés et glucogalactanes sulfatés (Love et Percival 1964; Matsubara et al. 2001). Certaines macroalgues vertes comme des *Caulerpa* ou *Ulva* contiennent de faibles quantités de galactanes sulfatés.

Les macroalgues vertes sont capables de synthétiser une grande variété d'autres types de polysaccharides sulfatés. Par exemple, un hétéroglycuronane composé de rhamnoses liés en (1-2,4), de xylose en (1,4) et acide glucuronique en (1,4) a été observé chez la macroalgue verte *Enteromorpha compressa* (Bimalendu Ray 2006). Un rhamnane sulfaté, composé de rhamnoses liés en positions α -1,3 et α -1,2 a également été extrait de *Monostroma nitidum* (Harada et Maeda 1998).

I.1.1.2.b. Les méthodes d'extraction des polysaccharides sulfatés des macroalgues

Extraction des fucanes

De nombreux protocoles d'extraction et de purification des fucanes sont décrits dans la littérature (Ale, Mikkelsen, et Meyer 2011).

Les premières méthodes d'extraction des fucoïdanes font état, pour la grande majorité des travaux, d'extraction aqueuse en présence d'un acide dilué à température ambiante (Nelson et Cretcher 1931; Hemmingson et al. 2006) ou légèrement plus élevée (Black, Dewar, et Woodward 1952; Nagaoka et al. 1999; Ale, Mikkelsen, et Meyer 2011) suivie par une précipitation éthanolique (Bird et Haas 1931; Nelson et Cretcher 1931). L'utilisation de différents acides (ou pour certains travaux, pas d'acide du tout) ainsi que les différences de temps et de température d'extraction ont été à l'origine de résultats différents en termes de composition et structure des fucoïdanes extraits (Ale, Mikkelsen, et Meyer 2011). Dans les travaux plus récents, il a été observé qu'un pré-traitement de la biomasse avant l'extraction était avantageux afin d'éliminer les composants de bas poids moléculaires comme les phénols par exemple. Les traitements décrits sont des méthodes utilisant du formaldéhyde (Mian et Percival 1973) ou, plus récemment, un mélange de méthanol, chloroforme et eau (Bilan et al. 2006; Cumashi et al. 2007). De plus, des enzymes protéolytiques peuvent-être utilisées pour retirer les protéines (Rocha et al. 2005).

Les extractions acides en présence de cations divalents sont souvent privilégiées, car elles permettent d'éviter la coextraction des alginates, ces extractions sont parfois assistées par l'utilisation de micro-ondes (Rodriguez-Jasso et al. 2011).

Extraction des carraghénanes

Différents procédés d'extraction des carraghénanes ont été développés selon la pureté désirée. En général, les algues rouges contenant les carraghénanes sont placées sèches dans une solution de chlorure de calcium sous agitation afin de fixer les carraghénanes dans les parois algales. Après cette étape, les algues sont broyées et les carraghénanes sont libérés dans le milieu sous forme soluble de sels de sodium. Les carraghénanes sont ensuite récupérés par filtration avec un filtre presse à chaud. Les carraghénanes contenus dans le filtrat sont finalement précipités par de l'alcool isopropylique et récupérés par passage sur un crible métallique pour être séchés à basse température. La précipitation des carraghénanes peut également être réalisée par des sels de potassium (Lai et Lii 1998; Kadam et al. 2015).

Extraction des ulvanes

L'extraction des polysaccharides est généralement réalisée par des solutions aqueuses contenant un agent chélatant cationique type oxalate d'ammonium, à des températures de 80 à 90 °C. Il existe différentes méthodes pour extraire les ulvanes. Généralement, celle-ci est réalisée par des solutions aqueuses à des températures comprises autour de 80-90°C contenant un agent chélatant cationique type oxalate de sodium (Lahaye et al. 2007; Robic et al. 2009), oxalate d'ammonium acide (Robic et al. 2009) ou basique (Ray et Lahaye 1995) ainsi que du DMSO, des acides... Cependant, il faut noter que la variation des paramètres tels que le pH, le temps d'extraction, la température influence le rendement d'extraction et la composition biochimique des extraits comme la quantité d'acides uroniques et de sucres neutres, le poids moléculaire...(Robic et al. 2009; Robic et al. 2009; Yaich et al. 2013). L'ulvane est ensuite récupéré par une précipitation à l'éthanol (Mao et al. 2006; Wang et al. 2013), acétone (Guerra-Rivas et al. 2011) ou avec un sel d'ammonium quaternaire. Les rendements en ulvane sont de 8 à 29 % du poids sec d'algues selon les procédures d'extraction et de purification (Sinquin et Collic-Jouault 2014).

Actuellement, de nouvelles techniques sont développées afin d'améliorer et de faciliter l'extraction des molécules algales et, en particulier des polysaccharides. Les nouvelles techniques d'extraction consistent en des extractions assistées par des enzymes, l'utilisation d'ultrasons, de microondes, des extractions par fluides supercritiques ou sous très hautes pressions (Kadam et al. 2015).

En termes de brevets, plusieurs procédés de fractionnement de macroalgues ayant pour objectif d'isoler et récupérer leurs polymères ont été décrits. Pour les protéines, le brevet US4439629, par exemple, décrit un procédé permettant une extraction et fractionnement sélectifs de protéines d'algues par une extraction à chaud avec de l'éthanol suivie d'une séparation des protéines par centrifugation, filtration, et sédimentation. Le brevet US2012065378 décrit un procédé permettant l'obtention de protéines d'Ulves par extraction à l'éthanol.

Pour ce qui est des polysaccharides, le brevet CN20021045386 propose la purification de polysaccharides de macroalgues brunes par infusion puis précipitation dans l'éthanol. Un autre brevet, le FR2738009 porte sur les fucoïdanes et décrit une méthode de déréticulation radicalaire pour produire des oligosaccharides ainsi que leur séparation par chromatographie d'exclusion haute performance. Concernant les Ulves, la demande US2010/1103390 décrit un procédé d'extraction à chaud, suivi d'une filtration et déminéralisation qui permet de récupérer une partie de leurs polysaccharides sulfatés. Les procédés qui sont aujourd'hui connus et utilisés

I.1.3. L'industrie des macroalgues

Au total, au moins 291 espèces de macroalgues sont utilisées dans le monde par au moins 43 pays. Parmi ces 291 espèces, 33 sont des Chlorophycées, 75 sont des Phaeophycées et 163 sont des Rhodophycées (Tiwari et Troy 2015).

A l'échelle mondiale, la production actuelle de macroalgues est de 21 millions de tonnes, dont plus de 94% proviennent de l'aquaculture. Entre 1995 et 2012, la production mondiale de macroalgues a augmenté de plus de 176% (FAO 2014). Cette augmentation est due à l'explosion de la production de Rhodophycées et Phaeophycées ; la production de Chlorophycées reste constante et très minoritaire (Figure 8A).

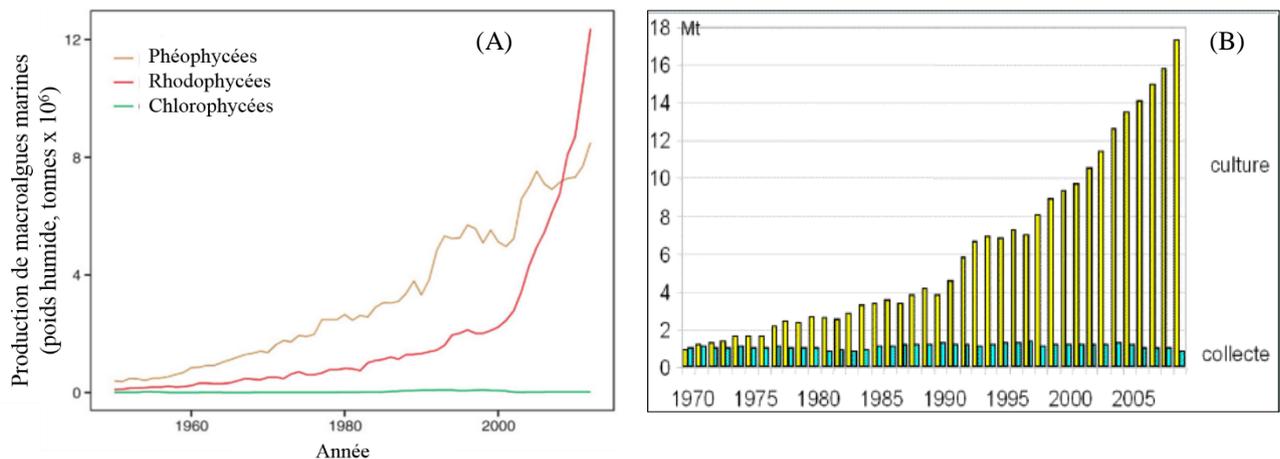


Figure 8 : (A) Production mondiale de macroalgues entre 1952 et 2012 (Tiwari et Troy 2015) et (B) Evolution de la collecte et culture de macroalgues dans le monde depuis 1970.

L'industrie des macroalgues pesait en 2003 environ 5,5 à 6 milliards de dollars. Parmi cette estimation, 5 milliards de dollars provenaient d'une utilisation comme produits pour l'alimentation humaine. Pour le reste (environ 1 milliard de dollars), la majeure partie était issue du marché des colloïdes puis, dans une moindre mesure, d'usages comme des fertilisants ou additifs pour l'alimentation animale (McHugh 2003).

En effet, l'algue est avant tout un légume au niveau mondial (Figure 9). Elle est consommée en alimentation humaine directe, comme ingrédient omniprésent dans la cuisine traditionnelle asiatique en particulier. Les usages industriels des macroalgues sont beaucoup plus répandus en Europe et en Amérique du Nord avec l'industrie des colloïdes. D'autres usages et applications plus traditionnels y sont aussi présents : agriculture (alimentation du bétail,

engrais organique), cosmétique (savon, crème, dentifrice), santé (enrobage des médicaments, propriétés amincissantes...) produits de nettoyage, industries textiles...

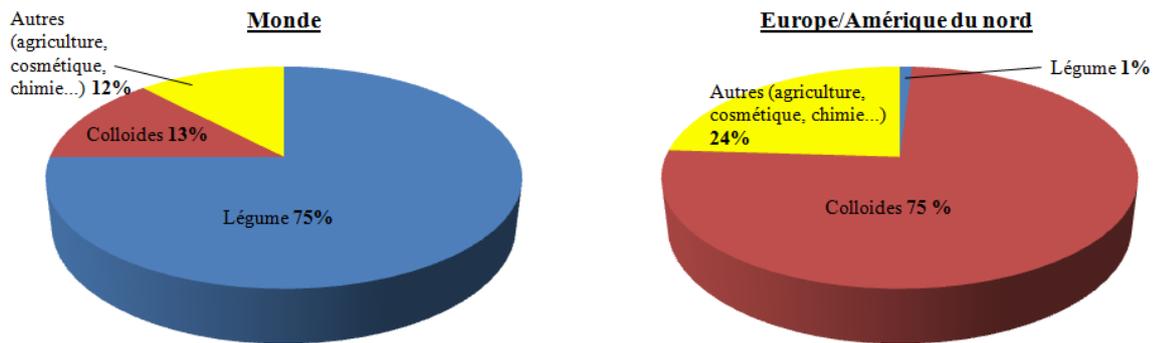


Figure 9 : Répartition de l'utilisation industrielle des macroalgues dans le monde et en Europe (CEVA)

I.1.3.1. Les macroalgues dans le domaine de l'alimentation humaine

L'usage des macroalgues dans l'alimentation humaine remonte respectivement au 4^{ème} siècle et 6^{ème} siècle au Japon puis en Chine. Aujourd'hui, ces derniers, en plus de la République de Corée, sont les plus grands consommateurs de macroalgues au monde. Cependant, l'utilisation des macroalgues dans l'alimentation s'étend à d'autres parties du monde.



Figure 10 : Répartition de la production mondiale de macroalgues en 2009 (CEVA)

Environ 145 espèces de macroalgues, soit 0,11% des espèces connues entrent dans la catégorie des algues comestibles (tableau III). La demande en algues alimentaires a largement augmenté ces dernières 50 années, dépassant ainsi les possibilités de la collecte d'algues sauvages. C'est pour cette raison qu'aujourd'hui, plus de 90% de la demande est assurée par des algues de culture (Figure 8B).

Le plus gros producteur de macroalgues comestibles est la Chine, avec environ 5 millions de tonnes de macroalgues fraîches par an. La majeure partie concerne le kombu, produit à partir de la macroalgue brune *Laminaria japonica*. La Corée, qui produit environ 800 000 tonnes d'algues comestibles non séchées par an, concentre 50% de sa production à la macroalgue brune *Undaria pinnatifida* pour le wakame. Le Japon, avec 600 000 tonnes est le troisième plus gros producteur et 75% de sa production sont destinés à la fabrication de Nori, issu d'une

algue rouge de l'espèce *Porphyra*. Ces trois algues couvrent 99% de la demande mondiale. L'Indonésie et les Philippines sont les autres producteurs principaux de macroalgues à l'échelle mondiale (Figure 10) (McHugh 2003).

Tableau III : Espèces de macroalgues comestibles (Pérez 1997)

Espèces consommées	Pays consommateurs
<i>Laminaria japonica</i> (Kombu)	Chine, Japon, Corée, Iles Sakhaline, Russie
<i>Laminaria augusta</i> (Kombu)	Japon, Corée, USA
<i>Laminaria ochotensis</i> (Kombu)	USA
<i>Laminaria saccharina</i> (Tangle)	France, Grande-Bretagne
<i>Laminaria longicuris</i> (Kombu)	USA, Canada
<i>Laminaria longissima</i> (Kombu)	Japon, Corée, USA
<i>Laminaria hyperborea</i> (Kombu)	Europe, USA
<i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame)	Japon, Corée, Chine, Australie, Taiwan
<i>Hizikia fusiforme</i> (Hiziki)	Japon, Corée, USA
<i>Heterochordaria abietina</i>	Japon
<i>Fucus serratus</i> (Varech dentelé)	France
<i>Fucus vesiculosus</i> (Varech vésiculeux)	France
<i>Fucus spirale</i> (Varech spiralé)	France
<i>Sargassum sp</i> (Limu-kala)	Polynésie, Hawaï
<i>Ascophyllum nodosum</i>	France
<i>Nemacystis depiciens</i>	Japon
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	USA
<i>Macrocystis pyrifera</i> (Kelp géant)	Nouvelle-Zélande, Argentine, Australie
<i>Durvillea antarctica</i> (Cochayuyo)	Chili
<i>Petalonia fascia</i>	USA
<i>Himanthalia elongata</i> (haricot de mer)	Europe
<i>Eisenia bicyclis</i> (Arame)	USA, Japon, Corée
<i>Alaria esculenta</i>	Europe, Japon
<i>Kjellmaniella gyrata</i>	USA
<i>Anilopus japonicus</i>	Japon
<i>Cladosiphon okamururus</i>	Japon
<i>Ecklonia kurome</i>	Corée, Japon
<i>Porphyra yesoensis et tenera</i> (Nori)	Japon, Corée, Chine, USA, nombreux pays
<i>Porphyra linearis</i> (faux Nori)	France
<i>Porphyra dentata</i> (faux Nori)	Chili, Nouvelle-Zélande
<i>Porphyra crispata</i> (faux Nori)	USA
<i>Grateloupia filicina</i>	Japon, Corée
<i>Carpopeltis angusta</i>	Japon, Corée
<i>Palmaria palmata</i> (Dulse)	Europe
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Chili, Japon, Corée, Chine, Taiwan, Philippines
<i>Gracilaria coronopifolia</i>	Philippines, Indonésie
<i>Gracilaria salicornis</i>	Philippines, Indonésie
<i>Meristotheca</i>	Japon, Sénégal
<i>Chondrus crispus</i>	France, Grande-Bretagne, Argentine
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Argentine
<i>Gelidiella acerosa</i>	Philippines
<i>Laurencia obtusa</i>	Philippines
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Philippines, Indonésie
<i>Gloiopeltis furcata</i>	USA
<i>Hypnea cervicornis</i>	Philippines
<i>Suhria vitata</i> (RedRibon)	Afrique australe
<i>Monostroma nitidium</i>	Japon
<i>Enteromorpha prolifera</i> (Ao Nori)	Japon, Corée, France, Philippines

<i>Ulva rigida</i>	Japon, Corée, France
<i>Codium sp</i>	Philippines
<i>Caulerpa racemosa</i>	Philippines, Japon
<i>Caulerpa lentillifera</i> (Raisins de mer)	Philippines, Indonésie
<i>Caulerpa serrulata</i>	Philippines, Indonésie

I.1.3.2. Les macroalgues dans l'industrie des colloïdes

Au niveau mondial, l'industrie des colloïdes est la deuxième consommatrice de macroalgues, largement après l'alimentation humaine. Cependant, dans la zone Europe/Amérique du Nord, elle représente plus de 75% de l'utilisation des macroalgues (Figure 9).

Dans cette industrie, trois hydrocolloïdes, extraits de macroalgues brunes et rouges sont utilisés : l'agar, les alginates et les carraghénanes. Ces polysaccharides hydrosolubles sont utilisés pour épaissir des solutions aqueuses et former des gels ou pour stabiliser certains produits par exemple. Aujourd'hui, l'industrie des phycocolloïdes (colloïdes extraits des algues) représente 1 milliard de dollars dans le monde (Bixler et Porse 2011). En Europe, cette industrie représente environ 130 millions d'euros par an, soit 97,5% du chiffre généré par l'ensemble des produits contenant des macroalgues en Europe

Tableau IV : Production mondiale de phycocolloïdes (d'après (Kraan 2012) (sources des valeurs (McHugh 2003; Bixler et Porse 2011))

Produit	Production globale (tonnes/an)	Prix au détail (\$US/kg)	Valeur approximative du marché (millions\$/an)	Quantité utilisée	
				Alimentaire (%)	Pharmacie (%)
Agars	9 600	18	173	80	15
Alginates	26 500	12	318	30	5
Carraghénanes	50 000	10,5	525	80	10

La production mondiale d'alginates représente 26 500 tonnes pour environ 318 millions de dollars par an (tableau IV). Les alginates sont extraits des macroalgues brunes, et principalement des espèces *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Mycrocystis* et *Lessonia* et, dans une moindre mesure, de *Durvillea*, *Ecklonia* et *Sargassum* (Bixler et Porse 2011). Les alginates sont utilisés dans l'industrie alimentaire, mais aussi dans l'industrie pharmaceutique, les crèmes cosmétiques la fabrication de papier et de carton (Chapman et Chapman 1980).

Deux types de colloïdes sont extraits de macroalgues rouges : les carraghénanes et l'agar. La production mondiale de carraghénanes dans l'industrie des colloïdes représente 50 000 tonnes par an et 527 millions de dollars (tableau IV). Les carraghénanes utilisés dans cette industrie (E407) proviennent des macroalgues rouges et plus particulièrement des espèces *Chondrus crispus*, *Kappaphycus*, *Eucheuma* et *Gigartina* (McHugh 2003; Kraan 2012).

L'agar est un mélange d'agarose et d'agaropectine ayant une structure et des propriétés comparables à celles des carraghénanes. Le marché des agars représente 9 600 tonnes par an pour une valeur de 173 millions d'euros (tableau IV). Les agars sont extraits de macroalgues rouges et, en particulier, des espèces *Gelidium* et *Gracilaria* (McHugh 2003; Joe et al. 2006; Rasmussen et Morrissey 2007).

I.1.3.3. Autres usages industriels des macroalgues

Les macroalgues font l'objet d'autres usages industriels, qui représentent cependant des quantités faibles par rapport à l'alimentation et les colloïdes (McHugh 2003) et représentent parfois des marchés de niches.

Les macroalgues peuvent être ainsi retrouvées dans des applications agricoles, comme fertilisants ou amendements des sols, dans l'alimentation animale (bétail ou aquaculture), mais également comme biomasse pour la production de biocarburants, dans le traitement des eaux usées ou encore dans la cosmétique (McHugh 2003) .

I.1.5. Les macroalgues, sources de composés bioactifs

Les macroalgues sont sources de composés divers et originaux comme des protéines, polysaccharides, vitamines, polyphénols, minéraux... Bien qu'au niveau industriel les macroalgues soient principalement utilisées comme légume ou agents gélifiants et épaississants dans les industries alimentaires ou pharmaceutiques (I.1.2.), de nombreuses études ont conclu quant au potentiel de certains de ses composés, et en particulier des polysaccharides sulfatés dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques ou nutraceutiques. Ceux-ci ont révélé des propriétés **anti-cancéreuse** (Dias et al. 2005; Fukahori et al. 2008; H. Ye et al. 2008; Lins et al. 2009), **anti-obésité** (Kim, Lee, et Lee 2010), **anti-oxydante** (Pilar et al. 2002; Rocha et al. 2007; Costa et al. 2010), **anti-coagulante** (Carlucci et al. 1997; Chevolot et al. 1999; Matsubara 2004; Majdoub et al. 2009; Jin et al. 2013; Kim et Wijesekara 2011), **immuno-inflammatoire** (Granert et al. 1994; Jiao et al. 2011; Mohamed, Hashim, et Rahman 2012), **anti-virale** (Damonte, Matulewicz, et Cerezo 2004; Jiao et al. 2011; Pujol et al. 2012; Rabanal et al. 2014; Witvrouw et De Clercq 1997)... Les composés bioactifs comprennent les polysaccharides sulfatés, phlorotannins, pigments, minéraux, peptides et sulfolipides.

Dans ce travail, nous nous intéresserons à l'activité anticoagulante d'extraits riches en polysaccharides sulfatés de macroalgues française puis, plus particulièrement d'ulvanes extraits d'*Ulva sp.* ainsi qu'à l'activité « anti-âge » d'extraits polysaccharidiques ou protéiques de ces macroalgues sur des fibroblastes dermiques humains.

I.2. Processus de coagulation et anti-coagulants

I.2.1. Physiologie de la coagulation

I.2.1.1. Le système hémostatique

Le **système hémostatique**, ou hémostase, est un processus physiologique qui regroupe l'ensemble des phénomènes déclenchés par une lésion au niveau d'un vaisseau et destinés à limiter les pertes sanguines au niveau de la brèche vasculaire. Lorsqu'un vaisseau sanguin est intact, les plaquettes ne sont pas activées par l'endothélium et le sang est fluide. Lorsqu'une brèche vasculaire rompt la continuité de la monocouche de cellules endothéliales et que les structures endothéliales se retrouvent en contact avec le sang, ceci provoque l'activation des plaquettes et leur adhésion au site de la lésion ainsi que l'activation de la coagulation plasmatique conduisant à la formation de la fibrine. Le thrombus, composé de plaquettes et de fibrine comble la brèche vasculaire. Classiquement, l'hémostase est divisée en trois étapes (Legru 2009; Richard 2013; Schved 2007):

- L'**hémostase primaire**. Il s'agit de la formation du clou plaquettaire, aussi appelé « thrombus blanc ». L'hémostase primaire est caractérisée par l'adhésion, activation et agrégation des plaquettes. La brèche vasculaire est fermée par l'agrégation des plaquettes entre elles avec le collagène des parois vasculaires.
- La **coagulation ou hémostase secondaire**. Cette étape est à l'origine de la constitution du « thrombus rouge ». La coagulation consolide le thrombus blanc en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges. Celle-ci est déclenchée par le contact entre le facteur XII, qui est une protéine plasmatique, et les tissus. S'ensuit alors une cascade complexe de facteurs de la coagulation avec, comme étape finale, la formation du caillot par la transformation d'une protéine du sang, le fibrinogène en fibrine polymérisée. Les phénomènes d'hémostase primaire et d'activation de la coagulation plasmatique sont simultanés et indépendants.
- La **fibrinolyse**. Cette étape permet la destruction des caillots ou la limitation de son extension. Avant la fibrinolyse, le caillot formé attire et stimule la croissance de cellules de muscles lisse et de fibroblastes au sein de la paroi vasculaire et entame le processus de réparation.

Dans ce travail, nous nous concentrerons surtout sur la phase de coagulation.

I.2.1.2. Le processus de coagulation

La coagulation suit le processus d'hémostase primaire. A la fin de l'hémostase primaire, un **thrombus plaquettaire** est formé. Cependant, celui-ci est fragile et nécessite une étape de consolidation qui fait intervenir cellules et facteurs plasmatiques : la coagulation. La coagulation est un enchaînement de réactions enzymatiques avec une enzyme centrale : la **thrombine**. Ce facteur central de la coagulation catalyse la formation d'un **complexe insoluble de fibrine** à partir de fibrinogène. La thrombine est auparavant formée par l'activation séquentielle de facteurs de coagulation circulant dans le plasma. Cette série

d'activation enzymatique survient à la surface des phospholipides membranaires des plaquettes, cellules endothéliales ou monocytes (Schved 2007; Richard 2013).

I.2.1.2.a. Première conception du phénomène de coagulation

La première conception du phénomène de coagulation a été décrite en 1964 (Davie et Ratnoff 1964). Elle est basée sur une coagulation en trois voies, avec une activation de la coagulation en deux voies : **la voie intrinsèque et la voie extrinsèque qui se rejoignent en une voie commune aboutissant à la formation du complexe de fibrine** (Figure 11) (Marcucci et Chassot 2015).

- La **voie intrinsèque** est déclenchée par le contact avec une surface chargée. Dans cette voie, tous les éléments nécessaires à la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. La réaction commence par l'activation du facteur XII en facteur XIIa et se termine par l'activation du facteur X en Xa. Le facteur Xa est à la jonction des trois voies.
- La **voie extrinsèque** commence lorsque la paroi d'un vaisseau est endommagée, causant la libération du facteur tissulaire (FT). Le FT se trouve dans des tissus (fibrocytes, collagène) qui sont normalement à l'extérieur de l'endothélium vasculaire. Lorsqu'il est libéré dans le sang, celui-ci active le facteur VII de la coagulation.

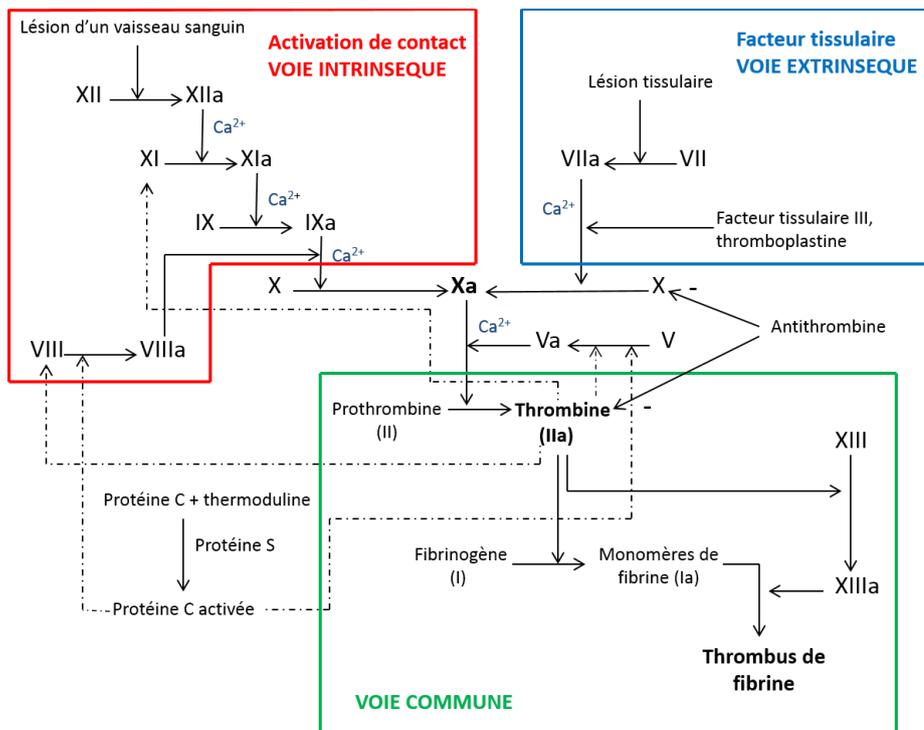


Figure 11 : Cascade de la coagulation dans sa représentation classique

Ce concept de la coagulation en trois étapes, avec une activation comportant une voie sérique, appelée voie extrinsèque et une voie initiée par lésion endothéliale appelée voie

intrinsèque correspond en fait au déroulement de la coagulation comme elle a lieu *in vitro*. En effet, cette cascade n'est pas appropriée à la situation *in vivo*, où les thrombocytes et l'endothélium jouent un rôle central. Cependant, cette représentation de la coagulation est très utile afin d'explorer le processus de coagulation puisque la voie extrinsèque, la voie intrinsèque et la voie commune sont toutes trois explorées par des tests coagulométriques : respectivement le **temps de prothrombine (TP)** ou temps de Quick, le **temps de céphaline activée (TCA)** et le **temps de thrombine (TT)**. Ainsi, bien que cela ne corresponde pas à la situation *in vivo*, c'est sur ce schéma que pourra se faire le raisonnement diagnostique d'interprétation des tests de coagulation (Schved 2007).

I.2.1.2.b. Conception actuelle de la coagulation : la voie cellulaire

Cette conception de la coagulation existe depuis le début des années 2000. Le déroulement de la coagulation *in vivo* ne respecte pas la distinction voie intrinsèque/voie extrinsèque. Elle est basée sur l'importance primordiale **d'éléments cellulaire** (Hoffman et al. 2001; Hoffman 2003) et permet de comprendre pourquoi la formation du caillot ne s'étend pas et reste localisée à l'endroit de la lésion.

i) Les intervenants du processus de coagulation

La coagulation fait intervenir différentes grandes classes de molécules (Richard 2013):

- Des protéines plasmatiques (inhibiteurs et facteurs de la coagulation)
- Des protéines membranaires (le facteur tissulaire)
- La vitamine K

Elle implique également deux grands types de cellules :

- La cellule portant le facteur tissulaire (cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire et des fibroblastes, peut-être exprimé par les monocytes ou cellules endothéliales dans certains cas de pathologies).
- Le thrombocyte circulant, possédant une surface phospholipidique chargée négativement et qui permet l'ancrage des facteurs de la coagulation.

a) Eléments cellulaires de la coagulation

La coagulation ne peut pas se dérouler sans la présence de cellules ou de certains de leurs constituants.

Le premier grand type de cellules nécessaire à la coagulation sont les cellules qui, après stimulation par certaines cytokines ou facteurs physico chimiques, peuvent exprimer le **facteur tissulaire (FT)**, dont le contact avec le sang est l'élément déclencheur principal de la coagulation.

Le deuxième type cellulaire nécessaire au processus de coagulation sont les **plaquettes sanguines**. En effet, lorsque les plaquettes sont activées, cela entraîne un flip-flop de la bicouche des phospholipides membranaires. Ce phénomène, induit par l'augmentation de calcium intra-cytoplasmique et l'activation ou inhibition d'enzymes membranaires provoque

l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS), un phospholipide anionique membranaire qui va servir de surface catalytique aux réactions de coagulation. De plus, dans certains cas extrêmes, les plaquettes sont capables d'émettre des microvésicules portant elle-même la PS à leur surface, pouvant ainsi supporter le phénomène de coagulation et donc l'amplifier (Schved 2007; Richard 2013).

b) Intervenants protéiques et vitamine K

Les protéines plasmatiques :

Les protéines plasmatiques peuvent être séparées en deux catégories : les **facteurs** de la coagulation et les **inhibiteurs** de la coagulation.

- Les facteurs de la coagulation (tableau V) :

Il existe différents facteurs de la coagulation

- **Le fibrinogène**, une protéine soluble, dimérique, capable de former un réseau de fibres qui constituera le caillot sanguin
- **Les pro-enzymes** de la coagulation : 5 sont des zymogènes de sérine protéases (facteurs II, VII, IX, X, XI) dont la synthèse de 4 d'entre eux (II, VII, IX, X) dépend de la vitamine K. Ils ont une forte affinité pour les phospholipides. 1 zymogène de transglutaminase (facteur XIII) possédant une forte affinité pour le fibrinogène.
- **Les co-facteurs**, qui sont des protéines possédant une affinité élevée pour les phospholipides et une affinité sélective pour une enzyme et son substrat. Tout comme les pro-enzymes, les co-facteurs doivent subir une protéolyse pour acquérir leur activité biologique.

Les facteurs de la coagulation existent sous deux formes : une **forme inactive** (prothrombine notée II par exemple) et une **forme active** (thrombine notée IIa par exemple). A l'état activé, chaque facteur pourra activer ou modifier certaines protéines impliquées ou non dans la coagulation.

Tableau V : Les facteurs de la coagulation (d'après (Schved 2007))

N° du facteur	Nom du facteur	Particularité	Temps de demi-vie
Facteur I	Fibrinogène	Absent du sérum	4-6 jours
Facteur II	Prothrombine	Vit. K dépendant	3-4 jours
Facteur V	Proaccéléline	Absent du sérum	12-36 heures
Facteur VII	Proconvertine	Vit. K dépendant	4-6 heures
Facteur VIII	Anti-Hémoph A	Absent du sérum	10-16 heures
Facteur IX	Anti-Hémoph B	Vit. K dépendant	24 heures
Facteur X	Stuart	Vit. K dépendant	1-2 jours
Facteur XI	Rosenthal		1-2 jours
Facteur XII	Hageman		2-3 jours
Facteur XIII	Stabilisant fibrine		3-7 jours

- Les inhibiteurs de la coagulation :

Il existe trois familles d'inhibiteurs de la coagulation principaux, qui ciblent les sérines protéases (antithrombine, notée ATIII), les co-facteurs (système de la protéine C noté PC – protéine S notée PS) ou l'inhibiteur TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Ils sont prédominants dans le plasma et régulent l'hémostase en permanence (Schved 2007; Richard 2013).

- **Antithrombine :** l'AT est un inhibiteur des sérines protéases de la famille des serpines. Il s'agit de l'inhibiteur central de la coagulation. Elle se lie à la thrombine et aux autres enzymes de la coagulation et les inactive. Elle est synthétisée par l'hépatocyte et est activée par la liaison à des glycosaminoglycanes (GAG) de la paroi vasculaire (héparanes sulfates) ou à l'héparine.
- **Protéines C et S :** Ce sont deux protéines vitamine K-dépendantes. La PC est un zymogène produit par l'hépatocyte et la PS est un co-facteur produit par l'hépatocyte et la cellule endothéliale. L'activation de la PC est assurée par la thrombine liée à un récepteur spécifique de l'endothélium : la thrombomoduline. La PC activée inhibe l'activité des facteurs Va et VIIIa en présence de protéine S.
- **Le TFPI :** Il s'agit d'une protéine de la famille des inhibiteurs de Kunitz produite par la cellule endothéliale. Cet inhibiteur est également appelé « Inhibiteur de la voie extrinsèque ». Il se lie au facteur Xa et au complexe facteur tissulaire-facteur VIIa et empêche l'activation du facteur X.

Les protéines membranaires

Il existe deux protéines membranaires principales dans la voie de la coagulation : **la thrombomoduline (TM)**, récepteur endothélial de la protéine C et **le facteur tissulaire (FT)**. Le facteur tissulaire est l'initiateur de la coagulation. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de 50 kDa exprimée constitutivement par les fibroblastes, kératinocytes et cellules épithéliales (Richard 2013).

La vitamine K

La **vitamine K** possède un rôle central dans le processus de coagulation : elle intervient après la traduction pour rendre les protéines vitamine K-dépendantes fonctionnelles (modifications post-traductionnelles dans l'hépatocyte). Elle est particulièrement présente dans la coagulation car elle rend fonctionnels les facteurs II, VII, IX et X ainsi que les inhibiteurs de la coagulation que sont les protéines C et S.

Les protéines vitamine K-dépendantes subissent, dans l'hépatocyte, une carboxylation de leurs acides glutamiques (Glu) par la carboxylase hépatocytaire qui utilise, comme co-facteur, la vitamine K réduite. Ainsi, les protéines fonctionnelles contiennent à leur extrémité N terminale 9 à 12 résidus carboxyglutamique (Gla). Ces résidus permettent la fixation des protéines aux phospholipides acides en présence de Ca^{2+} (Richard 2013).

ii) *Mécanisme de la coagulation*

La coagulation se fait en trois **étapes : une phase d'initiation, une phase d'amplification et une phase de propagation** (Hoffman et Monroe 2001; Hoffman 2003b, 2003a; Marcucci et Chassot 2015).

Etape d'initiation

La coagulation démarre lorsque le **facteur tissulaire se retrouve en contact avec le plasma à la suite d'une lésion vasculaire**. Celui-ci va alors activer le facteur VII (FVII puis FVIIa) pour lequel il possède une très haute affinité. Ce complexe FT/FVIIa active ensuite le facteur IX (IXa) et le facteur X (Xa). Ce dernier active et se lie au facteur V (Va) en présence de Ca^{2+} . Le complexe Va/Xa, appelé complexe prothrombinase déclenche la transformation du facteur II (prothrombine) en facteur IIa (thrombine). Cette étape d'initiation dure **5 à 7 minutes**. La thrombine a un **rôle central** dans le processus de formation du thrombus. Elle a plusieurs rôles, notamment :

- La formation de la fibrine à partir du fibrinogène qui va stabiliser le « thrombus blanc ». La thrombine est une enzyme très puissante capable de coaguler 1000 fois son poids de fibrinogène
- Elle intervient dans le recrutement de nouvelles plaquettes.
- Elle active les cofacteurs V, VIII et IX de la coagulation, catalysant ainsi sa propre génération.
- Elle active le facteur XIII qui joue un rôle majeur dans la stabilisation du caillot.

A la fin de la phase d'initiation, la thrombine n'a été produite qu'en petites quantités et ne conduit pas encore à la formation du thrombus. L'enchaînement reste ici localisé au niveau de la lésion de l'endothélium et la prolifération du complexe FT/FVIIa est restreint par le TFPI (tissue factor pathway inhibitor), qui est son inhibiteur circulant.

Etape d'amplification

La phase d'amplification se **déroule sur la surface des plaquettes**. Lorsque la lésion est suffisante, le facteur de von Willebrand traverse la barrière endothéliale et vient se fixer aux cellules qui portent le FT et les **plaquettes sont activées**.

La thrombine produite **en petites quantités** à la fin de la phase d'initiation est l'enzyme centrale de cette phase d'amplification. Dès qu'apparaissent des traces de thrombine, le processus de coagulation **s'amplifie** pour former un réseau de fibrine emprisonnant les érythrocytes. En effet, la faible quantité de thrombine formée a plusieurs rôles :

- Les plaquettes, qui possèdent à leur surface des récepteurs à la thrombine sont activées par la stimulation de leur récepteur par la thrombine.
- Elle active le facteur XI des plaquettes.
- Elle active le facteur V (Va) qui va former, en se liant au facteur Xa à la surface de la plaquette activée, le complexe prothrombinase. Cette étape est très importante car le complexe prothrombinase crée un système de rétro-action positive augmentant de manière exponentielle le nombre de plaquettes activées en transformant la prothrombine en thrombine activatrice des plaquettes. Cette phase nécessite la présence de calcium (Ca^{2+}).

Etape de propagation

Cette étape a lieu à la **surface des plaquettes**, correspond à la **formation de la fibrine et par l'installation d'un caillot au niveau de la lésion endothéliale**.

L'objectif de cette étape est l'augmentation de la production du facteur Xa, menant à une forte augmentation de la production de thrombine permettant ainsi de déclencher la transformation de fibrinogène en fibrine. Pour cela, le facteur XIa, activé à l'étape précédente d'amplification favorise la formation du facteur IXa, produit à l'étape d'initiation, à la surface des thrombocytes qui se lie alors au facteur VIIIa formant ainsi un complexe appelé complexe ténase situé à la surface des plaquettes. Le complexe ténase est à l'origine d'une augmentation de la production de facteur Xa qui se lie avec le facteur Va plaquettaire et forme le complexe prothrombinase Va/Xa.

Lors de cette étape, la fixation des plaquettes activées et leur agrégation au niveau de la lésion endothéliale se fait en parallèle de la stimulation de la chaîne coagulatoire.

La dernière étape, la fibrinoformation, correspond à la formation d'un réseau de fibrine emprisonnant les globules rouges et formant ainsi ce que l'on appelle le « thrombus rouge ». Les polymères de fibrine forment enfin un gel agglutinant les thrombocytes. Le degré de stabilité finale de l'ensemble thrombocytes-fibrine, qui détermine la qualité de l'hémostase et la fin du saignement, dépend des conditions locales : pH, température, concentration de calcium (Ca^{2+}), quantité de thrombine, de plaquettes, de fibrinogène et de facteur XIII. Le réseau de fibrine est stabilisé par des liaisons covalentes γ glutamine lysine générées par le facteur XIII activé (par la thrombine et le Ca^{2+}) entre les monomères de fibrine. Cette liaison conduit à la formation d'un **caillot de fibrine très solide**. Un second facteur de stabilisation est l'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFIa, *thrombin-activated fibrinolysis inhibitor*), qui réduit les points d'attache pour la plasmine. **Ces deux facteurs protègent le thrombus de la fibrinolyse.**

I.2.2. Les traitements anti-coagulants actuels

Les anti-coagulants font partie des médicaments **anti-thrombotiques**, au même titre que les **anti-plaquettaires** et les **thrombolytiques**.

Ce sont des médicaments utilisés dans la prévention et le traitement des maladies thrombo-emboliques. Malgré la possibilité d'**effets secondaires** potentiellement graves, le risque majeur étant hémorragique, ces médicaments présentent un rapport bénéfice/risque bien défini et sont utilisés dans de nombreux cas cliniques, et ce depuis plus de soixante ans.

Les anti-thrombotiques influent sur les trois processus de la thrombogénèse, c'est-à-dire la coagulation plasmatique, la réactivité plaquettaire et la fibrinolyse.

La première molécule identifiée (1916) puis utilisée comme anticoagulant (années 40) est l'**héparine**. Dans ces années là se développent également les premiers anticoagulants oraux (**antivitamines K**). Puis, depuis les années 40, l'arsenal thérapeutique pour le traitement et la prévention des pathologies thrombo-emboliques s'est progressivement étendu. Les héparines de bas poids moléculaires (**HBPM**) ont fait leur apparition à la fin des années 1980. Finalement, dans les années 2000, de nouveaux médicaments comme le fondaparinux et les anticoagulants oraux directs (**AOD**) sont mis sur le marché (ANSM 2014).

I.2.2.1. Les premiers anti-coagulants : une utilisation toujours majoritaire

I.2.2.1. a. Les héparines et dérivés

i) Les héparines non fractionnées (HNF)

Structure et mode d'action de l'héparine

Les HNF sont des **polysaccharides linéaires et anioniques** appelés **glycosaminoglycanes (GAG)**. La structure de l'héparine consiste en une répétition d'unités disaccharidiques composées d'acide β -D-glucuronique (GlcA) ou d'acide α -L-iduronique (IdoA) liés en (1,4) à une D-glucosamine (GlcN) (Figure 12) (Fu, Suflita, et Linhardt 2016).

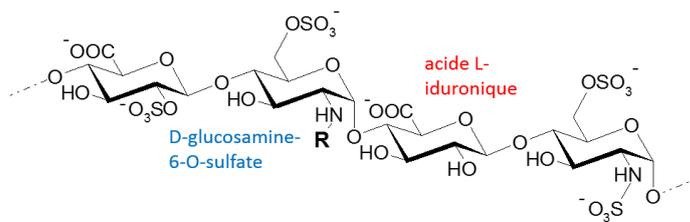


Figure 12 : Unité répétitive majoritaire de l'héparine $[-\text{GlcNR}-\alpha-(1,4)-\text{GlcA/IdoA}-\beta-(1,4)-]_n$

Ces unités dissaccharidiques peuvent toutefois subir des **modifications**. L'acide iduronique peut être 2-O-sulfaté (plus rarement l'acide glucuronique), le résidu GlcN peut être N-acétylé, N-sulfaté ou 6-O-sulfaté et/ou 3-O-sulfaté. L'héparine possède une sulfatation relativement uniforme et élevée correspondant à 2,3 à 3 groupements sulfates par unité disaccharidique) (Linhardt 2003).

Les HNF sont par ailleurs des mélanges hétérogènes de chaînes polysaccharidiques. Le poids moléculaire des chaînes d'héparines non fractionnées varie en effet de 4000 à 30 000 Da pour une moyenne située entre 12 000 et 15 000 Da (Elalamy 2007).

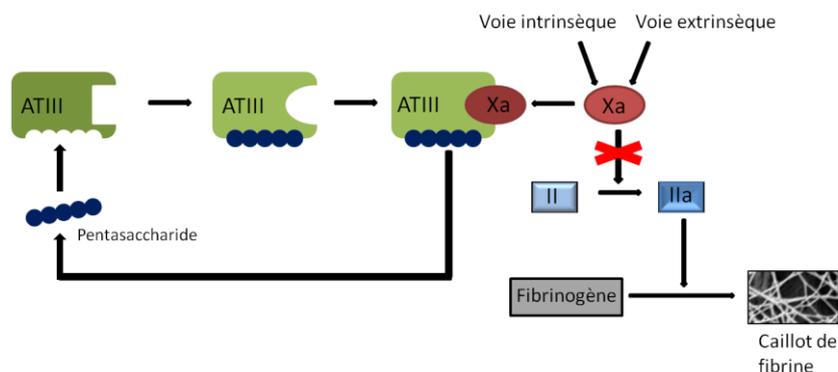


Figure 13 : Action de la séquence pentasaccharidique spécifique de l'HNF sur l'inhibition de l'activité anti Xa ATIII-dépendante d'après (Schiele 2001)

Les héparines sont des anticoagulants naturels dont le mode d'action est essentiellement dû à leur fixation à l'**anti-thrombine (ATIII)**. L'ATIII est un **inhibiteur**

plasmatique de type serpine de la plupart des serines protéases de la coagulation, et, en particulier, des facteurs IIa et Xa. Elle forme des complexes forts, irréversibles et équimolaires avec ses enzymes cibles par la formation d'un ester entre un résidu arginine de son centre actif et le résidu sérine du centre actif de l'enzyme. Il s'agit d'un processus dépendant de la température et du pH et surtout très lent. Cependant, lors de la fixation de l'héparine sur l'ATIII, cette dernière subit un changement de conformation qui amplifie son activité inhibitrice de l'ordre de **2000 fois**. L'interaction entre l'HNF et l'ATIII est rendue possible par la liaison d'une région riche en lysine de l'ATIII avec une **séquence pentasaccharidique spécifique**, l'« ATIII-binding site », que présente l'HNF. Ce site pentasaccharidique est donc une composante essentielle du mécanisme d'action de l'héparine.

Les HNF combinent une activité anti-IIa et une activité anti-Xa équivalentes. L'inhibition du facteur Xa par l'HNF dépend de l'« ATIII-binding site » : la fixation de l'HNF sur l'ATIII modifie la boucle réactive de l'ATIII et rend possible la fixation du facteur Xa sur l'ATIII, ce qui provoque l'emprisonnement irréversible du facteur Xa et la libération de l'héparine (Figure 13) (Zhang 1998; Schiele 2001; Elalamy 2010).

En ce qui concerne l'inhibition de la thrombine (facteur IIa) par l'HNF, le processus requière plus que la simple présence de la séquence pentasaccharidique. En effet, l'inhibition du facteur IIa nécessite en plus un site de liaison à la thrombine, appelé « **domaine T** » **composé de 13 unités osidiques**. Ainsi, les chaînes capables d'inhiber la thrombine ont une longueur minimale de 18 unités osidiques, correspondant à environ 5 400 Da (Figure 14) (Elalamy 2010).

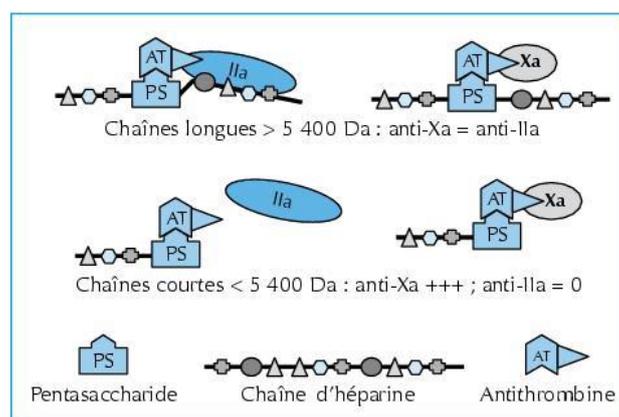


Figure 14 : Influence de la longueur de la chaîne polysaccharidique de l'héparine sur son activité inhibitrice des facteurs Xa et IIa (Elalamy 2007)

Un autre mécanisme de l'activité anti-coagulante de l'HNF concerne un autre inhibiteur plasmatique : le **cofacteur II de l'héparine (HCII)**. Contrairement à l'ATIII, l'HCII inhibe exclusivement la thrombine (facteur IIa) (Zhang 1998).

ii) Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM)

Le développement des HBPM résulte d'une meilleure compréhension de la biochimie de la cascade de coagulation. La découverte du fait que seule la liaison de l'ATIII à la séquence pentasaccharidique spécifique de l'héparine est suffisante pour l'inhibition de l'activité du facteur Xa, faisant de cette séquence un agent anti-Xa spécifique, a mené au développement d'HBPM comme inhibiteurs du facteur Xa. Le HBPM ont été développées sur le postulat que l'activité plus spécifique des HBPM par rapport aux HNF pourrait permettre une régulation plus subtile de la coagulation, réduisant le risque hémorragique associé aux traitements à base d'HNF.

Méthodes de production des HBPM

Les HBPM sont des mélanges hétérogènes de molécules dont les poids moléculaires se situent entre **3 et 8 kDa** avec une prédominance de bas poids moléculaires (poids moléculaire inférieur à 8 kDa selon la pharmacopée européenne). Généralement, les HBPM sont produites par **dépolymérisation partielle de l'héparine commerciale**. La production d'HBPM repose majoritairement sur la dépolymérisation chimique contrôlée de l'héparine par clivage peroxydatif, clivage à l'acide nitrique ou β -élimination (Figure 15) (Linhardt et Gunay 1999). Une autre méthode, enzymatique et donc plus douce fait intervenir des héparines lyases isolées de *Flavobacterium heparinum* (Lohse et Linhardt 1992; Xiao et al. 2011).

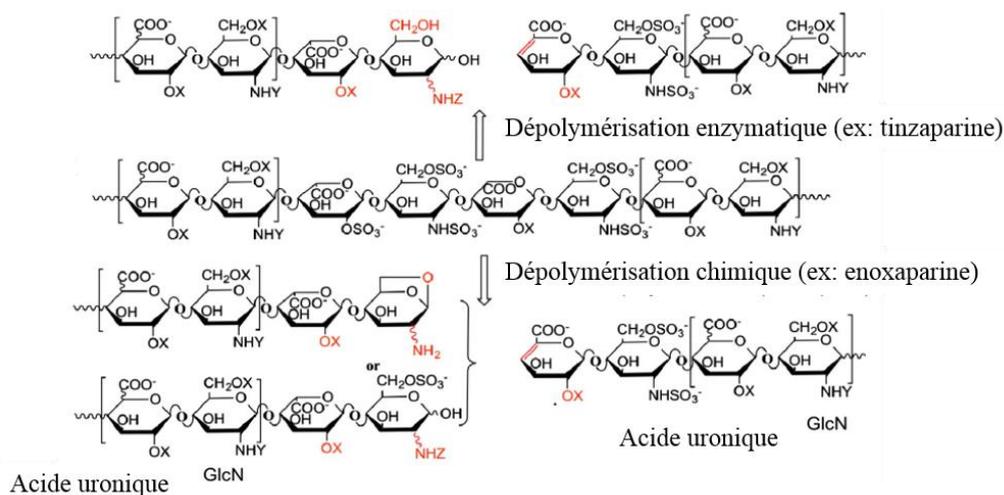


Figure 15 : Préparation des HBPM par dépolymérisation enzymatique et chimique (Fu, Suflita, et Linhardt 2016)

Applications médicales des HBPM

En fonction de leur méthode de préparation, des différences structurales distinguent les HBPM, ce qui a des conséquences sur leurs propriétés physicochimiques, mais aussi biologiques et pharmacologiques (Elalamy 2010). Cependant, elles ont toutes en commun d'être polydispersées et de présenter un poids moléculaire moyen de 5000 Da.

L'intérêt des HBPM, en comparaison avec les HNF, tient dans les résultats plus prédictibles qu'elles donnent en termes d'action pharmacologique, et ce car leurs propriétés physicochimiques sont mieux définies. De plus, leur biodisponibilité est largement supérieure (autour de 100%). En raison de leur haute biodisponibilité et de leur demi-vie plus longue, elles peuvent être injectées de manière sous-cutanée une fois par jour (Elalamy 2010).

iii) Problèmes posés par l'application médicale de l'héparine et de ses dérivés

L'utilisation des HNF engendre de nombreux effets secondaires chez le patient. Le plus important est le **risque hémorragique**, très fréquemment observé. L'incidence des accidents hémorragiques et des décès liés aux traitements hépariniques observée au cours des études cliniques varie entre 0 et 7% (0 à 2% de décès). De plus, un traitement prolongé (supérieur à 10 jours), représente un facteur de risque d'accidents hémorragiques graves. D'autres problèmes, non-hémorragiques, peuvent également survenir, dont les thrombopénies, dans 0,5 à 3% des cas, avec des conséquences graves et potentiellement fatales. Malgré le développement des HBPM qui a permis de réduire ces risques, les traitements à base d'héparine ou de ses dérivés continuent de présenter des effets secondaires potentiellement très graves (ANSM 2014).

De plus, les HNF sont d'**origine animale** et extraites majoritairement des muqueuses intestinales de porc, mais aussi de tissus bovins ou ovins. Ceci soulève notamment le problème de la sécurité biologique. En effet, ces sources d'origine animale peuvent contenir des agents infectieux menant à une transmission possible de maladies virales ou à prions. De plus, la vulnérabilité des populations animales aux maladies infectieuses, la sur-production ou les problèmes environnementaux peuvent réduire drastiquement l'approvisionnement d'animaux à partir desquels l'HNF peut être préparée.

Pour finir, un porc entier est nécessaire pour la production d'une ampoule d'HNF. Ceci, associé à sa faible biodisponibilité (30%), en fait une **molécule très chère**.

Bien que 1,2 milliards de porc au minimum soient tués chaque année pour la production de plus de 100 tonnes d'HNF, les fournisseurs pourraient ne pas être capables de répondre à l'augmentation de la demande mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement.

Ainsi, le développement de médicaments « héparine-like » d'origine non animale est un besoin urgent du marché actuel des anticoagulants.

I.2.2.1. b. Les antivitamines K (AVK)

Il s'agit de la classe d'anticoagulants la plus utilisée. Les AVK sont utilisés en relais de l'héparinothérapie lorsque le traitement est prolongé. Ils sont donc utilisés pour traiter les phlébites ou embolies pulmonaires, pour prévenir les embolies artérielles ou les maladies thromboemboliques récidivantes.

Leur activité anticoagulante est due à leur propriété d'inhibition du cycle de régénération de la vitamine K, ce qui a pour effet de diminuer les teneurs en facteurs II, VII, IX et X de la coagulation en fonction de leur demi-vie (respectivement 60h, 5h, 14h, 40h).

Les AVK sont représentés par deux familles pharmacologiques (ANSM 2014):

- Les **coumariniques**, avec l'acénocoumarol commercialisé sous le nom de Sintrom[®] et Minisintrom[®] et la warfarine commercialisée sous le nom de Coumadine[®].
- Un **dérivé de l'indanedione**, la fluindione commercialisé sous le nom de Previscan[®].

I.2.2.2. Nouveaux anti-coagulants développés depuis le début des années 2000

I.2.2.2.a. Les inhibiteurs du facteur Xa

Il existe deux types d'inhibiteurs de l'action du facteur Xa : les inhibiteurs indirects, dont l'action est médiée par l'ATIII ou l'HCII comme les héparines et dérivés par exemple et les inhibiteurs directs.

i) Les inhibiteurs indirects

- Le fondaparinux sodique

Le fondaparinux sodique, commercialisé sous le nom d'Arixtra[®] a été mis sur le marché en 2002. Il s'administre sous forme injectable par voie sous-cutanée. Il s'agit du premier agent de synthèse à **activité anti-Xa indirecte**. Il s'agit en fait d'un **pentasaccharide de 1 728 Da** synthétisé chimiquement et composé de la séquence nécessaire à l'action inhibitrice spécifique du facteur Xa induite par l'héparine à son extrémité réductrice méthylée (Figure 16). A la différence de l'héparine, le fondaparinux ne se lie pas à d'autres protéines plasmatiques que l'ATIII. Son mécanisme d'action consiste à se fixer à l'ATIII, induisant ainsi un changement conformationnel qui permet à l'ATIII de se lier au facteur Xa et de l'inhiber de manière irréversible 300 fois plus rapidement. Le fondaparinux peut ensuite se détacher et est disponible pour se fixer sur d'autres molécules d'ATIII (Elalamy 2007).

La biodisponibilité du fondaparinux après une injection sous-cutanée est de **100 %**. Sa demi-vie est de l'ordre de 17 heures. L'injection unique journalière est alors adaptée (Weitz 2006).

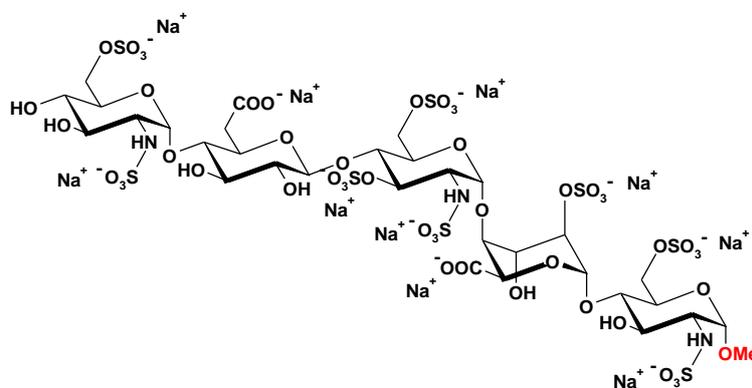


Figure 16 : Séquence pentasaccharidique du fondaparinux

Les succès de cette molécule de synthèse ont entraîné le développement de nouveaux pentasaccharides

- avec des propriétés pharmacologiques complémentaires au pentasaccharide original ;

- avec un perfectionnement de l'interaction avec l'ATIII, en désignant des molécules plus puissantes avec une affinité plus élevée pour l'ATIII, ou des molécules qui induisent une activation plus rapide et plus efficace de l'ATIII vis-à-vis du facteur Xa
- avec la synthèse de molécules mixtes composées d'une séquence de pentasaccharide et d'une séquence capable d'inhiber la thrombine et le facteur Xa

Deux molécules ont par exemple fait l'objet de recherches poussées, jusqu'en **phase III** par Sanofi. Il s'agit de l'**idraparinux**, une nouvelle molécule analogue au fondaparinux sodique (dérivé hyperméthylé) avec une demi-vie beaucoup plus longue chez l'homme, qui est d'environ 80 heures (voisine de celle de l'ATIII) et de l'un de ses dérivés, l'idrabioparinux. L'idraparinux présentait une efficacité prometteuse, similaire à celle des AVK dans les cas de phlébite ou de la prévention embolique lors d'une fibrillation auriculaire. Des complications d'ordre hémorragique ont cependant stoppé son développement. L'**idrabioparinux** présente quant à lui un antagoniste, l'avidine, permettant ainsi une certaine sécurité en cas d'accident hémorragique tout en conservant une efficacité comparable à celle de l'idraparinux. Cependant, Sanofi a également stoppé son développement pour des raisons peu claires et le brevet de la molécule est disponible depuis 2011 (Amadeus Investigators et al. 2008; van Gogh Investigators et al. 2007; Armaganijan et al. 2012).

- Le danaparoïde sodique

Le danaparoïde sodique, commercialisé sous le nom de Orgaran[®], est un héparinoïde de synthèse formé par un mélange de GAG d'un poids moléculaire moyen de 5 500 Da. Il est composé d'un **mélange d'héparane sulfate (84%), de dermatane sulfate (12%) et de chondoïtine sulfate** (Weitz et al. 2004). Ce mélange présente un mécanisme d'action indirect proche de celui de l'héparine, c'est-à-dire une action anti-Xa et anti-IIa médiée par l'ATIII, avec une action médiée par l'HCII pour l'activité anti-IIa. Cependant, contrairement à l'héparine, le danaparoïde possède une activité anti-Xa bien plus importante que l'activité anti-IIa (ANSM 2011).

ii) *Les inhibiteurs directs*

En inhibant le facteur Xa de manière sélective et spécifique, ces anticoagulants interrompent les voies intrinsèque et extrinsèque de la cascade de coagulation sanguine, prévenant ainsi la formation de thrombine et le développement du thrombus.

Ces médicaments sont très récents. Les deux principaux, le **rivaroxaban**, dérivé de l'oxazolidinone commercialisé sous le nom de Xarelto[®] et l'**apixaban**, commercialisé sous le nom de Eliquis[®], sont des inhibiteurs sélectifs du facteur Xa commercialisés respectivement depuis 2009 et 2012. Ces deux anticoagulants font partie des **NACO** (nouveaux anticoagulants oraux), désormais appelés AOD (anti-coagulants directs).

L'apixaban est une molécule de 460 Da (Figure 17A). Il s'agit d'un inhibiteur direct du facteur Xa libre et lié au complexe de la prothrombinase. Son temps de demi-vie est compris entre 9 et 14 heures, ce qui permet de ne réaliser qu'une prise quotidienne.

Le rivaroxaban est une molécule de 436 Da (Figure 17B). Il possède la même activité anti-Xa directe que l'apixaban avec un temps de demi-vie de 9 heures.

Etude bibliographique

Outre l'apixaban et le rivaroxaban, plus d'une dizaine de molécules de petite taille, inhibiteurs directs du facteur Xa, actifs soit par voie orale soit par injection, sont en cours d'étude avec des essais en phase II ou III. Ceux-ci sont recommandés dans la prophylaxie anti-thrombotique en chirurgie orthopédique à haut risque (genou, hanche) et dans le traitement des maladies thromboemboliques veineuses ou artérielle. Peuvent-être cités, par exemple : le fidexaban (voie parentérale), le tanexaban ou l'edoxaban (voie orale).

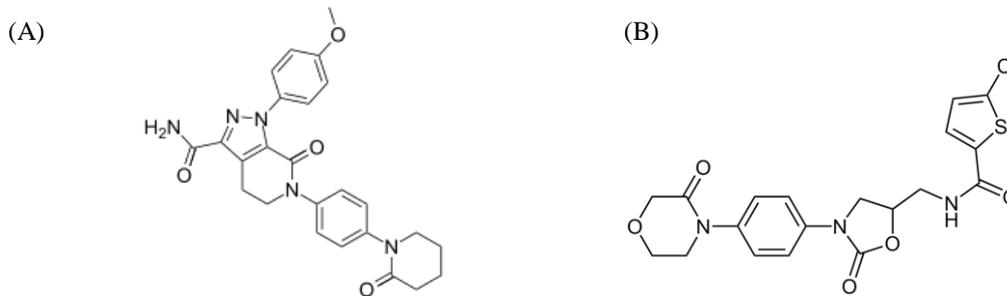


Figure 17 : Structure de l'apixaban (A) et du rivaroxaban (B)

I.2.2.2.b. Les inhibiteurs de la thrombine (facteur IIa)

En plus des inhibiteurs indirects de la thrombine, comme les héparines ou le danaparoïde sodique, une place croissante est occupée par les **inhibiteurs directs de la thrombine, bloquant ainsi la génération de la fibrine et tous les effets amplificateurs de la thrombine sur les plaquettes ou la cascade de la coagulation** (activation des facteurs V, VIII, XI et XIII). Ils sont capables d'inhiber spécifiquement la thrombine libre ou liée au caillot en pénétrant au sein des mailles de fibrine, à la différence des inhibiteurs indirects qui sont de grande taille (Weitz et al. 2004).

- Les **dérivés de l'hirudine**, actifs par voie parentérale :

L'hirudine est un peptide de 65 acides aminés extrait de la salive de sangsue. Cette molécule présente une très forte affinité pour la thrombine, et aurait pu être active à des doses permettant d'inhiber localement la thrombine du caillot sans être profondément anticoagulante au niveau systémique. Cependant, à cause d'une mauvaise compréhension de son mode d'action et de la physiologie des thromboses, la molécule a été utilisée à des doses trop anticoagulantes ce qui a été la cause de nombreux surdosages et la molécule a quasiment cessé d'être prescrite (Weitz et al. 1990; Markwardt 1993; Drouet et Ripoll 2006). Trois hirudines recombinées sont aujourd'hui disponibles en France : La désirudine, commercialisée sous le nom de Revasc[®], la lépirudine commercialisée sous le nom de Refludan[®] et la bivalirudine commercialisée sous le nom d'Angiomax[®]. Ces molécules ont un pouvoir inhibiteur de la thrombine très élevé mais 10 fois inférieur à celui de l'hirudine naturelle (Elalamy 2007). La lépirudine et la désirudine sont actifs par inhibition indirecte du site actif de la thrombine tandis que la bivalirudine est active par inhibition par liaison directe au site actif de la thrombine (Drouet et Ripoll 2006).

- Premiers inhibiteurs directs de la thrombine actifs par voie orale :

Les premiers travaux sur des inhibiteurs directs de la thrombine actifs par voie orale ont mené à la synthèse du melagatran et de sa prodrogue, le ximelagatran. Le melagatran est un peptidomimétique de 430 Da spécifique de la thrombine capable de se lier de manière réversible au niveau de son site actif inhibant ainsi la thrombine libre et celle liée au réseau de fibrine. Un prodologue lipophile du melagatran a été créé, le ximelagatran (Exanta[®]), empêchant l'ionisation de la molécule au pH intestinal. Cependant, des cas d'insuffisance hépatocellulaire sévères ont été détectés et la molécule a été retirée du marché (Elalamy 2007).

Certains dérivés sont en cours de développement comme un ximélagatran de 2^{ème} génération (AZD0837) en phase II ou le flavogatran en phase III.

Il n'existe aujourd'hui qu'un seul inhibiteur direct de la thrombine administrable par voie orale commercialisé. Il s'agit du dabigatran etexilate commercialisé sous le nom de Pradaxa[®] depuis fin 2008. Ce médicament fait partie, au même titre que l'apixaban ou le rivaroxaban, des NACO. Le dabigatran est un inhibiteur direct puissant, compétitif et réversible de la thrombine et est la principale substance active plasmatique (Vidal).

I.2.3. Le marché des anticoagulants

I.2.3.1. Marché international

La plupart des anticoagulants sont utilisés pour prévenir ou soigner les problèmes de thromboembolisme veineux et fibrillation atriale. Il existe 16 anticoagulants commercialisés pour les problèmes de thromboembolisme veineux, fibrillation atriale, syndrome coronaire aigu, crises cardiaque ou AVC (accident vasculaire cérébral). Le marché global des médicaments utilisés dans les cas de thromboembolisme veineux a pesé **4 milliards de dollars et 2014** et des projections attendent une croissance de 8,3% en 2018 pour atteindre 5,5 milliards de dollars (analyses DelveInsight). La même analyse prévoit un marché de 13,28 milliards de dollars en 2018 pour les traitements de la fibrillation atriale, ce qui correspond à une croissance de 14% par rapport à 2014 (7,86 milliards de dollars).

Par exemple, l'usage des **NACO est en pleine expansion**. En 2014, le rivaroxaban (Xarelto[®], Bayer/Johnson & Johnson) et l'apixaban (Eliquis[®], Bristol-Myers Squibb/Pfizer) faisaient parti du top-20 des médicaments avec la croissance la plus rapide aux USA. Ajoutés au dabigatran et exilate mesylate (Pradaxa[®], Boehringer Ingelheim), ces trois médicaments représenteront selon les estimations environ 36% du marché américain d'anticoagulants d'ici 2020 (en volumes de prescription).

Le marché global des anticoagulants est dominé par l'Amérique du nord avec en premier les USA puis le Canada. En Europe, l'Allemagne, la France et le Royaume-Uni sont les plus gros utilisateurs d'anticoagulants. Le marché Asiatique est également en pleine expansion, en particulier en Chine, Inde et Japon (données rapport DelveInsight, "Anticoagulants-Competitive Landscape, Market & Pipeline Analysis, Forecasted Market Size 2015-2018").

1.2.3.2. Le marché français

En France, le marché des anticoagulants est largement dominé par les ventes d'**HBPM**. En 2014, 181 millions de DDJ (doses définies journalières) d'HBPM étaient vendues contre 24 millions pour les HNF et 14 millions pour les autres anticoagulants injectables (Figure 18).

Le fondaparinux, commercialisé depuis 2003, représente environ 16 millions de DDJ en 2013. Cependant, on observe une **forte augmentation de la vente d'anticoagulants oraux** depuis le début des années 2000 puisque leur vente a doublé entre 2000 et 2012 (croissance particulièrement marquée à partir de 2011). Parmi ces anticoagulants oraux, les ventes d'AVK ont doublé entre 2000 et 2012 avant une légère décroissance en 2013. Les NACO (ou AOD), montrent quant à eux une progression très rapide depuis leur introduction sur le marché français en 2009 (Figure 18) (donnés ANSM 2014).

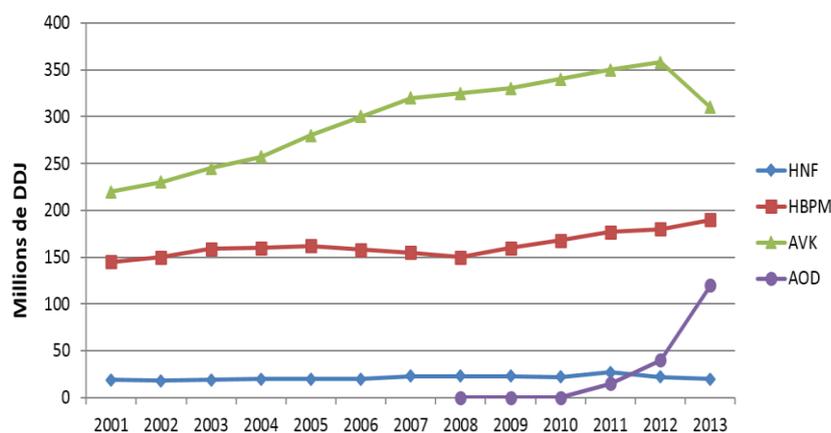


Figure 18 : Evolution annuelle des ventes d'anticoagulants injectables et oraux en nombre de DDJ (doses définies journalières) (ANSM 2014)

1.2.4. Les polysaccharides de macroalgues, de nouvelles sources d'anticoagulants ?

1.2.4.1. Les différentes sources de polysaccharides sulfatés

L'intérêt des polysaccharides pour le traitement des maladies thrombo-emboliques a commencé en 1916 par la découverte de l'héparine par McLean (McLean 1916). Depuis, la recherche sur les polysaccharides naturels ou modifiés dans ce domaine a considérablement augmenté. L'origine de ces polysaccharides peut être animale, bactérienne ou végétale.

- Certains **GAG non-hépariniques d'origine animale** ont montré des activités intéressantes comme anticoagulants ou antithrombotiques tels que le sulfate de dermatane, le sulfate de chondroïtine, le sulfate d'acharane ou le sulfate de kératane (Zhang 1998).

- Les **EPS (exopolysaccharides) bactériens** pourraient être une bonne alternative aux traitements hépariniques. En effet, certaines bactéries ont la capacité de produire des GAG-mimétiques (Sinquin et Collic-Jouault 2014). Ainsi, la souche d'*E. coli* K5 produit un précurseur d'héparine (Li et al. 2013). Néanmoins, celui-ci étant désulfaté, il est inactif. Toutefois, il est imaginable de produire, par ingénierie bactérienne, des polysaccharides actifs comme anticoagulants après modification chimique et/ou enzymatique. Le pullulane, par exemple, a montré des activités *in vitro* comparables à celles de l'héparine après dépolymérisation et sulfatation chimique (Alban 2002). Peu de travaux existent sur les polysaccharides bactériens d'origine marine. Une étude montre cependant le potentiel de cette source de polysaccharides, un polysaccharide bactérien extrait de *Alteromonas infernus* ayant des propriétés proches de celles de l'héparine avec, en particulier, une activité anti-thrombotique supérieure à celle de l'héparine et une activité anticoagulante inférieure, réduisant ainsi les risques hémorragiques et en faisant alors un bon candidat comme traitement anti-thrombotique (Collic Jouault et al. 2001). Les polysaccharides bactériens sont donc extrêmement intéressants pour la production de molécules anticoagulantes. Cependant, la production industrielle de polysaccharides bactériens est encore très limitée en raison des coûts de ce type de production. Le développement des techniques de biotechnologie bactérienne et des glycosciences devrait multiplier les molécules de cette origine dans le futur.

- De nombreuses publications attestent du potentiel des **polysaccharides sulfatés extraits de macroalgues** en termes d'activité anticoagulante. En effet, leur structure, et en particulier la présence des groupements sulfates, leur permet de posséder des propriétés héparino-mimétiques.

1.2.4.2. L'intérêt des polysaccharides de macroalgues comme anti-coagulants

Un certain nombre de macroalgues, en particulier des Phaeophycées, ont été étudiées pour leurs activités anti-coagulantes. Il a été montré que les polysaccharides sulfatés de ces macroalgues étaient à l'origine de l'activité observée. La **relation entre la structure chimique et l'activité anti-coagulante du polysaccharide n'est toujours pas complètement résolue** et elle peut varier d'une espèce à l'autre. Cependant, différents travaux ont montré que des facteurs tels que le **poids moléculaire, la composition osidique et la quantité et position des groupements sulfates sur le polysaccharide** jouaient un rôle majeur sur son activité anticoagulante (Barros Gomes Camara et al. 2011; Jin et al. 2013).

De nombreuses études existent sur le potentiel anti-coagulant des polysaccharides sulfatés de macroalgues dont la très grande majorité concerne les fucoïdanes des macroalgues brunes. Cependant, les mécanismes responsables de l'activité anticoagulante des macroalgues induite par les polysaccharides sulfatés ne sont pas complètement compris. Une activité anti-coagulante directe, en particulier sur l'activité anti-IIa, c'est-à-dire antithrombine indépendante a été observé chez différentes espèces de macroalgues comme chez les macroalgues brunes *Laminaria brasiliensis* et *Fucus vesiculosus* (Grauffel et al. 1989; Pereira, Mulloy, et Mourão 1999). Au contraire, d'autres fucanes ont montré une activité directe très faible, comme chez *Ecklonia kurome* (Nishino, Aizu, et Nagumo 1991a). Les mécanismes de

l'activité anti-IIa antithrombine ou héparine cofacteur II dépendante ont également été étudiées et ce type d'activité a été reporté pour les polysaccharides sulfatés de plusieurs espèces de macroalgues brunes comme *Fucus vesiculosus*, *Pelvetia canaliculata* ou *Ascophyllum nodosum* (Church et al. 1989; Collicet et al. 1991; Mauray et al. 1995). Tandis qu'une activité anti-Xa intéressante a été démontrée pour certains polysaccharides spécifiques (Church et al. 1989), certaines études ont montré des résultats contradictoires. Plusieurs études portant sur les fucoidanes montrent également qu'ils présentent des activités intéressantes sur les voies de la coagulation, en inhibant généralement les voies intrinsèque et commune de la coagulation (Jin et al. 2013). Ces études ont également montré que leur activité dépendait de leur composition osidique, de leur masses molaires et de leur teneur en sulfates (Chevolot et al. 1999; Jin et al. 2013).

Certains travaux démontrent également l'intérêt des polysaccharides sulfatés de macroalgues rouges, en particulier les carraghénanes lambda, des polysaccharides riches en galactoses sulfatés, comme anticoagulants (Melo et al. 2004; Gómez-Ordóñez, Jiménez-Escrig, et Rupérez 2014). Une autre étude porte sur l'intérêt de galactanes sulfatés extrait de la macroalgue rouge *Gelidium crinale* dans le traitement de la thrombose veineuse ou comme agent anti-Xa (Pereira et al. 2005).

Bien qu'il existe des travaux observant le potentiel anti-coagulant de polysaccharides sulfatés extraits d'algues vertes, ces travaux sont très minoritaires et concernent les macroalgues du genre *Codium* (Jurd et al. 1995; Siddhanta et al. 1999; Matsubara et al. 2001; Shanmugam, Mody, et Siddhanta 2001; Ciancia et al. 2007; Li et al. 2015), contenant principalement des arabinanes et arabinogalactanes sulfatés, ainsi que du genre *Monostroma* possédant des rhamnanes sulfatés (Zhang et al. 2008; Mao et al. 2008). Mao *et al* ont toutefois montré le potentiel de certains ulvanes comme agents anti-coagulants. En effet, des ulvanes extraits d'*Ulva conglobata* présentent une activité intéressante, en particulier sur la voie intrinsèque et/ou commune de la coagulation (test aPTT) ainsi qu'une activité anti-IIa dépendante du cofacteur II de l'héparine proche de celle de l'héparine. Une caractéristique remarquable de ces ulvanes d'*Ulva conglobata* est leur très forte teneur en sulfates, certains polysaccharides étant sulfatés à la hauteur de 35% (Mao et al. 2006).

De plus, certaines études se sont penchées sur l'impact de certaines **modifications moléculaires** sur l'activité biologique de ces polysaccharides. En effet, certaines modifications moléculaires pourraient modifier la structure dimensionnelle, la masse moléculaire et le type, le nombre et la position des substituants et avoir un impact sur les activités biologiques de ces polysaccharides. Différents types de modifications ont été réalisées comme des modifications chimiques (carboxyméthylation, sélénezation, sulfatation, phosphorylation, acétylation, alkylation ou dégradation acide/basique), physiques (ultrasonication, microondes, radiations) ou biologiques (en particulier enzymatiques) (Li et al. 2016)

Exemple de brevets concernant ces nouvelles sources d'anticoagulants

Il existe aujourd'hui plusieurs brevets sur le potentiel des polysaccharides de macroalgues comme anti-coagulants. Jusqu'à aujourd'hui, aucune molécule de cette origine ne se trouve sur le marché.

- Polysaccharides sulfatés, agent anticoagulant et agent anti-complémentaire obtenus à partir de fucanes d'algues brunes et leur procédé d'obtention (EP 0403377 A1, WO 1990015823 A1, 1990, US 5321133 A, 1990)
 - ⇒ Polysaccharides sulfatés obtenus à partir de fucanes extraits de Pheophycées. Le poids moléculaire de ces polysaccharides est compris entre 5 et 40 kDa, leur taux de sulfates est supérieur à celui des Fucus d'origine et leur contenu en protéines contaminantes est inférieur à 0,15%. Activité anticoagulante et agents anti-complémentaires.

- Composition contenant du polysaccharide ou polysaccharide ayant une activité héparinoïde, procédé pour sa préparation et anticoagulant contenant le même comme ingrédient actif (EP 0475383 A2, 1992)
 - ⇒ L'innovation implique : 1) un extrait riche en polysaccharides et un polysaccharide présentant chacun une activité héparinoïde, obtenus à partir d'algues vertes appartenant au genre *Cordiaceae* ; 2) un procédé pour produire ces polysaccharides ainsi que 3) un anticoagulant contenant comme ingrédient actif ce polysaccharide ou extrait.

- Method for obtaining sulphated polysaccharides (US09011750, 2000)
 - ⇒ Méthode pour obtenir des polysaccharides sulfatés de fucanes issus de Phaeophycées en utilisant la dépolymérisation radicalaire en présence d'un catalyseur métallique et de peroxyde d'hydrogène. La méthode produit des fractions polysaccharidiques avec des masses molaires de 10 000 Da ou moins avec des activités anticoagulantes.

- Utilisation de fucoïdane de faible masse moléculaire dans la préparation d'un médicament destiné au traitement de maladies cardio-vasculaires et cérébrovasculaires (WO 2008028410 A1, 2008)
 - ⇒ Utilisation de fucoïdanes de faible poids moléculaire dans la préparation de médicaments pour le traitement des maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires. Les fucoïdanes de faible poids moléculaire de l'invention peuvent être issus de fucoïdanes extraits de Kelp, *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia kurome* ou *Chorda filum*.

- Method for treating thrombotic disorders using sulfated polysaccharides (US 20080107678 A1, 2008)
 - ⇒ Méthode pour traiter les sujets ayant besoin de réduire leur coagulation sanguine par voie orale. Le traitement comprend une quantité thérapeutique d'un ou plusieurs fucoïdanes.

I.3. L'activité dermo-cosmétique « anti-âge »

I.3.1. L'histologie de la peau

La peau est un organe complexe, barrière entre le milieu extérieur et intérieur du corps. Chez l'homme, elle représente 1,2 à 2,3 m² pour environ 5 kg, ce qui en fait l'un des organes les plus importants.

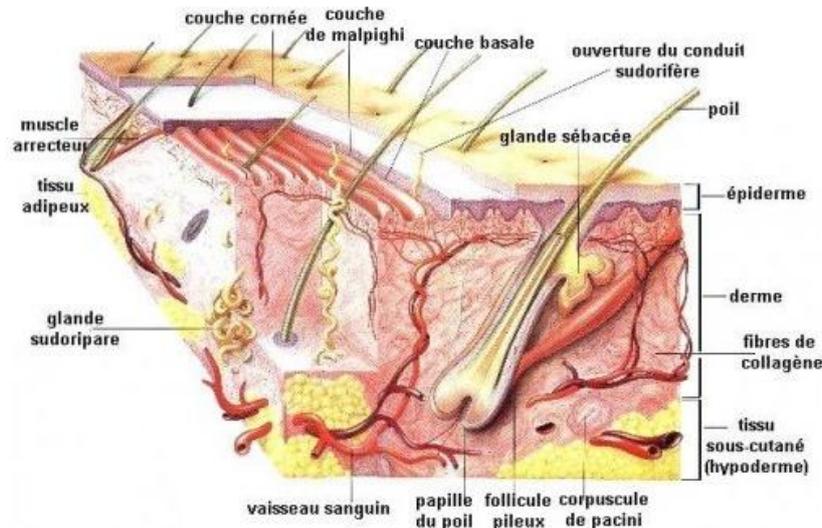


Figure 19 : Schéma des différentes couches de la peau (centre de médecine et chirurgie esthétique)

Elle a deux rôles majeurs : tout d'abord, assurer la communication entre l'organisme et le milieu environnant. En effet, la peau contient des récepteurs sensibles à la pression (mécanorécepteurs), à la chaleur (thermorécepteurs) et à la douleur (nocirécepteur). Son deuxième rôle principal est de protéger l'organisme des agressions extérieures. Elle exerce une barrière physique efficace contre les agents bactériens et viraux présents dans l'environnement, limite les pertes de chaleur et garde les fluides corporels et les électrolytes à l'intérieur de l'organisme. La peau est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 19).

I.3.1.1. L'épiderme

L'épiderme est la **couche superficielle** de la peau. Il assure la protection de l'organisme et évite sa déshydratation et est en constant renouvellement. Il est innervé mais, contrairement au derme, n'est pas vascularisé. Selon la zone du corps, l'épaisseur de l'épiderme varie beaucoup, de l'ordre de 0,1 mm au niveau des paupières jusqu'à plus de 1 mm sur la plante des pieds par exemple.

L'épiderme est un épithélium stratifié pavimenteux orthokératosique constitué de plusieurs types cellulaires dont les mélanocytes, responsables de la pigmentation, les cellules de Merckels qui jouent le rôle de mécanorécepteurs et les cellules de Langhérans, des cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules principales de l'épiderme sont toutefois les kératinocytes (80 à 90%), qui sont organisés en plusieurs couches de cellules en

différenciation. Les contacts cellules-cellules sont médiés par des structures de types desmosomes et jonctions communicantes (seulement dans la couche basale) (Donaldson et Mahan 1988; Méliissopoulos et Levacher 1998; Dréno 2009; Martini 2011; Montagnat-Rentier 2014).

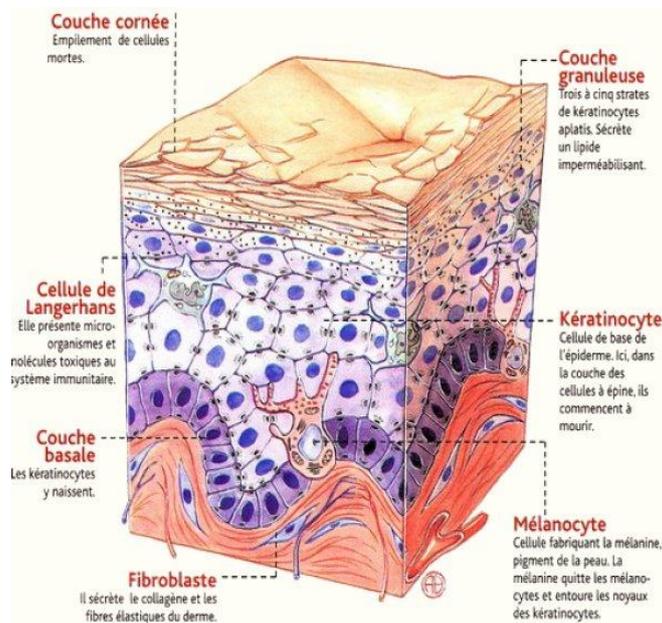


Figure 20 : Schéma en coupe de l'épiderme et de ses constituants (planète GAIA)

L'épiderme est composé de **4 couches superposées** qui sont (de la profondeur à la surface) (Figure 20) :

- La couche basale : Il s'agit de la couche la plus profonde de l'épiderme, aussi appelée « couche germinative » ou *stratum basal*. La couche basale n'est composée que d'une seule couche de cellules, en majorité des kératinocytes, et c'est elle qui permet de faire le lien avec le derme. En effet, les cellules basales sont attachées à une membrane basale acellulaire séparant le derme et l'épiderme par des hémidesmosomes formant ce que l'on appelle la jonction dermo-épidermique. Les cellules composant la couche basale ne sont pas différenciées mais forment une couche proliférative ayant la capacité de synthétiser les kératinocytes des couches supérieures, les hémidesmosomes et la matrice extracellulaire (MEC) de la membrane basale.
- La couche épineuse : Egalement appelée *stratum spinosum*, couche du corps muqueux de Malpighi ou encore couche à épines, la couche épineuse est constituée de 5 à 15 couches de kératinocytes attachées entre eux par les desmosomes. Le nombre de desmosomes importants présents dans cette couche lui confère une grande résistance mécanique.
- La couche granuleuse : La couche granuleuse ou *stratum granulosum* est composée de 2 à 3 couches de kératinocytes aplatis en phase terminale de différenciation.

- La couche cornée : La couche cornée, ou *stratum corneum* est composée de 5 à 15 couches de cellules. Il s'agit de la couche la plus superficielle de l'épiderme et qui est en contact avec l'environnement extérieur. La couche cornée est elle-même formée de 3 couches : le *stratum lucidum*, ou couche claire qui n'existe que sur la plante des pieds et paumes des mains, le *stratum compactum*, ou couche compacte, où les cellules sont encore très soudées entre elles, et le *stratum disjonctum*, ou couche desquamante, qui est la couche la plus externe et contient des kératinocytes complètement différenciés appelés cornéocytes. Ceux-ci ne possèdent plus de noyaux et sont constitués principalement de kératine. Ils sont liés entre eux par un « ciment lipidique » constitué d'acides gras insaturés, de céramide et de cholestérol. Cette couche cornée est une couche protectrice semi-perméable empêchant la perte en eau, maintenant une hydratation satisfaisante de la peau et évitant une hyperhydratation.

I.3.1.2. Le derme

Le derme, situé sous l'épiderme est constitué de **tissus conjonctifs caractérisés par une MEC abondante** entourant les cellules constitutives du derme, les **fibroblastes et le fibrocytes** à l'origine de la synthèse de la MEC. D'autres cellules peuvent également être présentes dans le derme comme des adipocytes ou des macrophages et mastocytes par exemple provenant de la moelle hématopoïétique. La MEC est composée de **substance fondamentale amorphe et de fibres élastiques et de collagène**. Le derme est également le siège d'implantation des annexes cutanées comme les glandes sébacées, les glandes sudoripares et les follicules pileux (Prost-squarcioni et al. 2008).

Les tissus conjonctifs du derme n'ont pas qu'une fonction de remplissage ; ils sont à l'origine de sa **résistance mécanique aux forces de pression et de traction**. De plus, les tissus conjonctifs ont d'autres fonctions ; les macromolécules de la MEC servent de réservoirs à d'autres molécules actives, les cellules ont un rôle de sentinelle, de remodelage, réparation...(Beylot et Martin 2007)

I.3.1.2.a. Organisation du derme

Le derme, dont l'épaisseur varie de 1 à 4 mm en fonction de la zone du corps, est séparé de l'épiderme par une barrière appelée **jonction dermo-épidermique**. Au contraire, il n'existe pas de limite franche entre le derme et la couche inférieure appelée hypoderme (Prost-squarcioni et al. 2008).

Le derme est composé de deux couches :

- Le **derme papillaire**, situé entre les crêtes épidermiques est constitué de tissu conjonctif lâche très vascularisé avec des fibres, des cellules et la substance amorphe en proportions équivalentes. Il mesure entre 500 et 100 µm. Il contient des fibres de collagène fines et orientées de manière perpendiculaire ou oblique par rapport à la surface de la peau, des fibroblastes, des fibres du réseau élastique, des cellules hématopoïétiques, les anses capillaires terminales ainsi que des terminaisons

nerveuses. C'est là que se font les échanges nutritifs avec la couche basale de l'épiderme.

- Le **derme réticulaire**, plus profond, est beaucoup plus épais (entre 0,8 et 1,2 mm) et est formé d'un tissu conjonctif dense où les fibres sont dominantes par rapport aux cellules et à la substance fondamentale amorphe. Dans cette couche, les fibres de collagène sont épaisses et s'entrecroisent avec les fibres élastiques en formant des plans grossièrement parallèles à la surface cutanée. Il contient également des veinules et artérioles, des petits nerfs, des follicules pilo-sébacés, des canaux excréteurs des glandes sudoripares...Le derme réticulaire est en continuité avec les septas situés entre les lobes graisseux de l'hypoderme qui servent de passage aux vaisseaux et nerfs destinés au derme.

I.3.1.2.b. Cellules constitutives du derme

i) *Les macrophages*

Les macrophages sont dérivés de la moelle osseuse. Ils se différencient en monocytes dans le sang, puis en macrophages dans le derme où ils perdent leur potentiel prolifératif. Les macrophages ont un rôle de défense et interviennent lors de l'intrusion d'un corps étranger. Ils sont activés par différents facteurs tels que l'interféron γ , les cytokines pro-inflammatoires, les protéines bactériennes, l'hypoxie...Ils jouent un rôle dans l'orchestration des réponses immunitaires et la réorganisation des tissus en recrutant des cellules inflammatoires, stimulant l'angiogénèse et synthétisant des fibroblastes. Ils sécrètent des metalloprotéinases, dégradant ainsi la MEC en régulant la phase inflammatoire, la phase de contraction, la prolifération des fibroblastes et le dépôt de la MEC.

ii) *Les cellules dendritiques dermiques (CDD)*

Les CDD sont localisées dans le derme profond. Les CDD sont des cellules présentatrices d'antigène qui peuvent déclencher des réponses immunitaires et constituent donc une deuxième ligne de défense derrière les cellules de Langerhans. Les CDD ont la capacité de capturer les antigènes, de se différencier en cellules présentatrices d'antigène et de migrer vers le ganglion lymphatique local pour présenter l'antigène apprêté aux cellules T et B (Bouloc 2001).

iii) *Les mastocytes*

Les mastocytes sont des cellules d'origine hématopoïétique qui représentent 2 à 8% de la population cellulaire du derme et sont localisés préférentiellement à proximité de la jonction dermo-épidermique, autour des petits vaisseaux et des terminaisons nerveuses.

Les mastocytes produisent de nombreux médiateurs physiologiques (histamine, héparine, prostaglandines, PAF, ECF-A, leucotriènes, facteur de nécrose tumorale, enzymes protéolytiques et cytokines) qui jouent un rôle important dans des processus variés comme l'hypersensibilité de type immédiate, l'inflammation, la défense vis-

à-vis de certaines bactéries ou parasites, la réponse à une prolifération tumorale, la réparation des plaies et le remodelage tissulaire accompagnant la cicatrisation normale ou pathologique (fibrose), l'angiogenèse... (Mélissopoulos et Levacher 1998; Prost-squarcioni et al. 2008).

iv) Fibroblastes-fibrocytes

Les fibroblastes et fibrocytes sont les **cellules principales du derme**. Elles sont capables de se multiplier activement et sont présentes dans tous les tissus conjonctifs puisqu'elles en produisent tous les constituants et en assurent le renouvellement. Les fibroblastes, cellules jeunes et actives se distinguent des fibrocytes qui sont des fibroblastes moins actifs mais pouvant être réactivés à la demande.



Figure 21 : Observation microscopique de fibroblastes de la peau humaine

Les fibroblastes forment une **population très hétérogène et multifonctionnelle** habituellement identifiés sur la base de caractères non spécifiques par leur forme (Figure 21), fusiforme ou étoilée avec des prolongements très fins venant au contact d'autres cellules sans fusionner avec elles, la présence de filaments intermédiaires de vimentine, la synthèse de collagènes interstitiels et de fibronectine.

Les fibroblastes **sont à l'origine de la synthèse des constituants de la MEC conjonctive comme le collagène, l'élastine, les protéoglycanes, les glycoprotéines de structure...** ainsi que de la **synthèse de protéines capable de la dégrader**, les métalloprotéases, participant ainsi à son renouvellement. De plus, les fibroblastes ont une activité de fibroclase (phagocytose des fibres) et participent à la synthèse de la lame basale séparant les cellules épithéliales, musculaires, adipeuses et gliales du tissu conjonctif du derme.

Les fibroblastes interviennent également dans la modulation des phénomènes immunitaires locaux en synthétisant diverses cytokines et facteurs chimiotactiques capables de recruter les cellules du compartiment sanguin.

Ils jouent également un rôle de protection contre l'athérome par la présence de leurs récepteurs membranaires, intervenant ainsi dans le métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol.

Pour finir, les fibroblastes sont capables, en cas de besoin, de se transformer en myofibroblastes, particulièrement lors des processus de cicatrisation. Les myofibroblastes, riches en α -actine du muscle lisse et en myosine ont ainsi la double caractéristique de cellules

synthétisant la MEC et de cellules contractiles (Prost-squarcioni et al. 2008; Martini 2011; Méliissopoulos et Levacher 1998).

I.3.1.2.c. La matrice extracellulaire

Le terme de MEC désigne l'ensemble constitué des macromolécules extracellulaires, du tissu conjonctif et des autres tissus. La MEC est constituée en grande partie de **glycoprotéines** et de **protéines**, ainsi que de **glycosaminoglycanes** chez les animaux. C'est une structure complexe formée d'un réseau très organisé de **fibres de collagène, de fibres élastiques et de fibres réticulaires** ainsi que d'un gel amorphe appelé **substance fondamentale**.

i) Les collagènes

Les collagènes sont les **protéines les plus abondantes du règne animal**. Ce sont des protéines synthétisées par des types cellulaires variés : fibroblastes du derme, chondrocytes du cartilage, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses des parois vasculaires, kératocytes de la cornée, ostéoblastes des os... Chaque catégorie cellulaire produit préférentiellement un ou plusieurs types de collagène. Il existe de nombreux collagènes (notés de I à XXI) regroupés en 7 catégories selon le mode d'assemblage de leurs molécules élémentaires (fibrilles à striation périodique, réseaux, filaments perlés, d'ancrage...).

Le **tropocollagène** est l'unité fondamentale du collagène : elle correspond à une molécule asymétrique de 280 nm de long et de 1,5 nm de diamètre. Il s'agit d'une glycoprotéine formée par l'enroulement de 3 hélices gauches α , porteuses de glucide (glucose, galactose), superenroulées en hélice droite. Les acides aminés sont constitués pour un tiers de glycine (tous les 3 acides aminés), pour un quart de proline, d'hydroxylysine et de 4-hydroxyproline.

Les glucides sont fixés sur l'hydroxylysine. Le super-enroulement des 3 chaînes α constitue la molécule de tropocollagène, dont la cohésion est assurée par des liaisons hydrogène entre la glycine et l'hydroxyproline. Les molécules de tropocollagène s'assemblent ensuite pour former des fibrilles de collagène. L'assemblage des fibrilles de collagène est à l'origine des fibres de collagène.

Dans la peau humaine, **les collagènes fibrillaires sont de loin les protéines les plus abondantes, constituant plus de 90% de son poids sec**. Dans la MEC, les fibres constituées de collagène regroupent les fibres de collagène et les fibres de réticuline. Ces fibres sont formées d'un assemblage de fibrilles à striation périodique. Selon le type de fibres, le nombre et diamètre des fibrilles sont variables ; les fibres de collagène sont constituées de fibrilles de diamètre important rassemblées en gros trousseaux denses tandis que les fibres de réticuline sont constituées de fibrilles de faible diamètre isolées les unes des autres ou regroupées en petits trousseaux lâches.

Biochimiquement, les fibres de collagène du derme sont constituées des collagènes fibrillaires I, III et V. Le collagène de type I représente 60 à 80% des collagènes du derme et de l'hypoderme alors que le collagène de type III compte pour 15 à 25% et le collagène de type V pour 2 à 5%. Les collagènes fibrillaires de type I, III, et V s'auto-assemblent en fibres

plus épaisses qui forment un réseau tridimensionnel dans toute l'épaisseur du derme. Ils donnent à la peau sa force de résilience et sont essentiels à son intégrité tissulaire.

Les fibres de réticuline sont quant à elles composées de collagène de type III et sont observées au niveau de la jonction dermo-épidermique et des lames basales des vaisseaux sanguins, des nerfs et des adipocytes.

Le réseau de collagène est organisé et maintenu sous une tension mécanique dynamique fourni par les fibroblastes responsables de sa production.

La fonction des fibres de collagène est de donner au derme son épaisseur et sa résistance aux forces de traction (van der Rest et Garrone 1991; Myllyharju et Kivirikko 2001; Ricard-Blum et Ruggiero 2005; Prost-squarcioni et al. 2008).

ii) Les fibres élastiques

Les fibres élastiques peuvent être séparées en trois sortes de fibres : les fibres **oxytalan**, les fibres d'**élaunine** (immatures) et les fibres **élastiques matures**.

- Les fibres oxytalan, exclusivement constituées de microfibrilles, sont localisées dans le derme et forment de fines arborisations perpendiculaires à la jonction dermo-épidermique. Les fibres oxytalan sont transverses par rapport aux autres fibres élastiques et sont les premières à disparaître lors du vieillissement.

- Les fibres d'élaunine sont des fibres élastiques immatures, plus courtes et moins large que les fibres élastiques matures. La composante fibrillaire de ce type de fibres est prédominante sur les plages amorphes. Elles forment un plexus à la jonction entre le derme papillaire et réticulaire parallèle à la surface cutanée.

- Les fibres élastiques matures contiennent beaucoup de substance amorphe et sont localisées dans l'hypoderme et dans le derme réticulaire.

Ces trois types de fibres élastiques sont distingués en fonction de leur contenu en microfibrilles et d'élastine.

L'élastine constitue les plages amorphes des fibres élastiques. C'est une protéine de 68 kDa non glycosylée, hydrophobe, constituée de 750 acides aminés, principalement prolines et glycines. L'élastine est formée par l'assemblage de monomères de tropoélastine synthétisés par les fibroblastes et stabilisée par la formation d'acides aminés de pontage sous l'effet de la lysyl-oxydase : la desmosine et l'isodesmosine. **C'est l'élastine, et en particulier la tropoélastine qui la compose, qui confère aux fibres élastiques leur élasticité et leur résilience et permet à la peau de reprendre sa position d'origine quand elle est pincée ou étirée**

Les microfibrilles sont majoritairement constituées de fibrilline 1 chez l'adulte. Elles contiennent également de la fibrilline 2, FLP (fibrillin-like protein), émiline (ou GP115), MAGP (microfibril associated glycoprotein), lysyl-oxydase et de la protéine de liaison du TGFβ latent (LTBP-2). Les fibrillines s'associent pour former les microfibrilles à la surface extérieure du fibroblaste sous le contrôle de la cellule. Elles forment une trame sur laquelle se fixe l'élastine (pour les fibres d'élaunine ou les fibres élastiques matures) ou non (pour les fibres oxytalan).

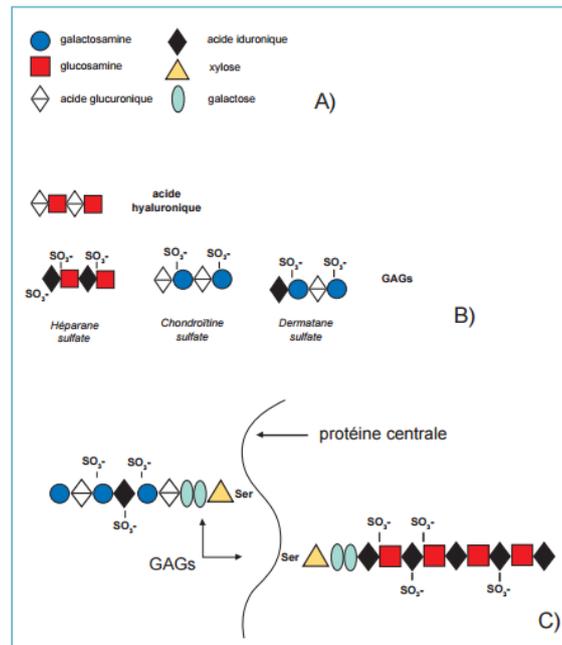
Etude bibliographique

Les fibres élastiques ont pour fonction majeure l'**élasticité de la peau**. En effet, elles peuvent-être étirées de 120 à 150% et revenir à leur état initial. Lorsqu'un individu vieillit, les fibres élastiques vieillissent avec lui et changent d'aspect dès l'âge de 30-40 ans ; il s'agit du **vieillessement intrinsèque physiologique**. Les fibres élastiques peuvent également être fortement modifiées (augmentation de leur diamètre, fragmentation) sous l'effet de facteurs externes comme le soleil ou le tabac. Ce phénomène est appelé **vieillessement extrinsèque** (Prost-squarcioni et al. 2008).

iii) *La matrice extrafibrillaire ou substance fondamentale amorphe*

La substance fondamentale amorphe est composée essentiellement d'**acide hyaluronique**, un glycosaminoglycane (GAG) non sulfaté ainsi que de **glycoprotéines**, d'**eau** et de GAG sulfatés associés à un axe protéique pour former des **protéoglycanes**. Cet ensemble forme un gel très compressible qui permet la circulation de l'eau et des molécules dissoutes, organisant l'ensemble de la MEC et régulant la fibrillogénèse. Cette substance fondamentale a également un autre rôle qui est celui de réservoir de facteurs de signalisation cellulaire qui sont à l'état latent mais facilement mobilisables.

- Les protéoglycanes sont constitués d'un axe protéique appelé protéine centrale ou core protein sur lequel se fixent, par des liaisons covalentes, des chaînes de GAG (Figure 22).



Les GAG sont des chaînes linéaires sulfatées composées de la répétition d'un diholoside contenant un glucosamine ou galactosamine et un autre ose (xylose, galactose, acide glucuronique ou iduronique). Le sulfate de chondroïtine, le sulfate de dermatane, le sulfate de kératane et le sulfate d'héparane sont les principaux GAG qui, liés à des protéines forment les protéoglycanes de la peau. Les plus répandus sont le versican, la décorine et le perlécane : le

versicane est produit par les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, et les kératinocytes et est impliqué dans le maintien de la fermeté cutanée, le perlécane se trouve dans les membranes basales et la décorine se lie aux fibrilles de collagène de type I.

- Les principales glycoprotéines sont les laminines, les matrilines, la vitronectine, les thrombospondines, la fibronectine, et les tenascines ; elles participent à l'adhésion, la migration des cellules et à la communication cellulaire (Prost-squarcioni et al. 2008).

- L'acide hyaluronique est un GAG linéaire non ramifié et non sulfaté constitué d'une succession d'unités disaccharidiques composées d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques alternées β - 1,4 et β - 1,3 (Figure 23). La molécule est constituée de 2000 à 25000 dissacharides pour une masse molaire pouvant varier de 10^5 à 10^7 Da et une longueur de 2 à 25 μm .

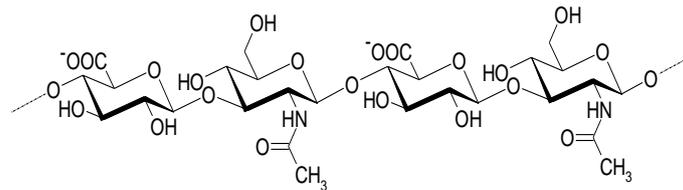


Figure 23 : Structure de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique a été identifié dans tous les tissus de vertébrés. Cependant, plus de **50% de la quantité totale d'acide hyaluronique se trouve dans la peau**, et plus particulièrement dans le **derme** (le derme papillaire est le plus riche). En effet, même s'il est retrouvé dans l'épiderme, et plus particulièrement dans l'espace intercellulaire au niveau des couches spinieuse et granuleuse ainsi que dans l'espace intracellulaire, dans la couche basale, il y représente une fraction très minoritaire par rapport à la quantité présente dans le derme. L'acide hyaluronique ne s'associe pas à des protéines et est **synthétisé à la face interne de la membrane cytoplasmique et excrété tel quel par les fibroblastes**. La concentration d'acide hyaluronique est variable selon l'âge des tissus. En effet, elle est très élevée dans les tissus « jeunes » et diminue lors du vieillissement intrinsèque. Elle est également importante dans les tissus en réparation suite à des plaies normales ou pathologiques.

Il joue un rôle structural important, en tant que matrice sur laquelle peuvent se fixer une centaine de protéoglycanes sulfatés. Ces structures supramoléculaires peuvent retenir de très larges quantités d'eau et d'ions pour maintenir la turgescence et l'hydratation des tissus. Il possède par ailleurs des faces chargées grâce à la présence des groupements carboxyles des acide glucuronique. La répulsion mutuelle de ces groupements va permettre à la molécule de s'étendre dans la MEC et d'attirer l'eau. Lors de compression, l'eau pourra être chassée, permettant la contraction de la molécule qui pourra reprendre sa forme initiale grâce à cette force de gonflement. **Cette propriété est à l'origine de la résilience et malléabilité de la MEC** (Prost-squarcioni et al. 2008; Vigetti et al. 2014; Robert 2015; Dicker et al. 2014).

I.3.2. Le vieillissement cutané

Le vieillissement cutané est le résultat de deux principaux facteurs que sont le **vieillissement intrinsèque** et le **vieillissement extrinsèque**. Le vieillissement intrinsèque est un processus naturel résultant d'une dégradation naturelle des tissus.

Avec l'âge, la peau se modifie et elle vieillit, provoquant l'apparition de rides ou de sécheresse cutanée. D'autres facteurs, notamment le soleil, le tabac ou la pollution par exemple dégradent la peau et accentuent le phénomène de vieillissement cutané. De nos jours, la lutte contre ce vieillissement cutané et l'apparition des signes de l'âge comme les rides sont très demandés. Nombre de produits cosmétiques revendiquant une action « anti-âge » font leur apparition sur le marché.

I.3.2.1. Le vieillissement intrinsèque

Le vieillissement intrinsèque, également appelé vieillissement physiologique ou chronologique est largement déterminé par des facteurs génétiques et est associé entre autres à une augmentation de la fragilité de la peau, une perte de son élasticité.... Il est caractérisé par une **atrophie du derme** qui est due à une **diminution de la quantité de collagène de type I, une désorganisation des fibres élastiques et une déshydratation de l'épiderme** due à une diminution de la quantité d'acide hyaluronique (Bogdanowicz et Redoules 2012). Il s'agit d'un processus lent qui dépend du temps et du bagage génétique de chacun. Il existe différentes causes expliquant ce vieillissement dont les quatre majeures sont le **raccourcissement des télomères, la variation de l'activité hormonale** (en particulier hormones sexuelles), **la sénescence cellulaire et le stress oxydatif**,

I.3.2.1.a. Le raccourcissement des télomères

A chaque mitose, les télomères subissent un raccourcissement appelé **sénescence répllicative**. Cette érosion des télomères détermine la durée de vie de la cellule. A chaque mitose, les télomères raccourcissent d'environ 150 paires de bases ; la majorité des cellules ont une capacité de doublement entre 60 et 70 réplifications (Harley, Futcher, et Greider 1990; Ning 2003). Lorsque les télomères deviennent très courts, les cellules entrent en sénescence répllicative (ou limite de Hayflick) (Greider 1990).

I.3.2.b. Les facteurs hormonaux

Certains travaux ont montré qu'avec l'âge, la production d'hormones stéroïdiennes diminue (Simon et al. 1992; Roshan, Nader, et Orlander 1999). Lors de la ménopause, en particulier, la carence en œstrogènes est à l'origine du vieillissement cutané. En effet, les glandes sébacées, les follicules pileux, les kératinocytes et les fibroblastes possèdent des récepteurs aux œstrogènes qui stimulent la production de collagène, d'acide hyaluronique et participent à l'hydratation de la peau. Ainsi, lorsque les hormones diminuent avec l'âge, ceci entraîne un amincissement de la peau, une diminution du collagène, une baisse de tonicité...(Khayati 2009)

De plus, des travaux ont montré une réduction progressive des concentrations circulantes en hormones de croissance (GH) en en Insulin-like factor (IGF-I) lors du vieillissement physiologique (Russell-Aulet et al. 2001).

Il a été montré que le traitement substitutif par des oestrogènes chez des femmes ménopausées améliore le statut fonctionnel de la peau, ainsi que ses propriétés mécaniques (Fuchs et al. 2003).

I.3.3.1.c. La sénescence cellulaire

Lors du vieillissement intrinsèque, on observe une combinaison d'évènements incluant une **diminution de la capacité proliférative des cellules de la peau, une diminution de la synthèse de la matrice du derme et une augmentation de l'expression d'enzymes dégradant la matrice de collagène** (Jenkins 2002).

Nombre d'études ont mis en évidence la capacité réduite de prolifération cellulaire des cellules d'une peau âgée par rapport à celle d'une peau jeune, que ce soit les fibroblastes (Schneider et Mitsui 1976; Mets, Bekaert, et Verdonk 1983; Cristofalo et Pignolo 1993), les kératinocytes (Gilchrest 1983) ou les mélanocytes (Gilchrest et al. 1984; Medrano et al. 1994). Ces observations vont dans le sens de la théorie voulant que la division cellulaire soit la clé derrière la perte de la capacité répliquative des cellules et finalement le changement du phénotype cellulaire. Ce phénomène est appelé **sénescence cellulaire** (Dimri et al. 1995). Lors de ce phénomène, les cellules ne peuvent plus entrer en phase S de réplication et restent bloquées en phase G1. Ceci peut être expliqué par l'inhibition sélective de différents gènes de régulation de la croissance dont l'expression est importante pour la progression de la phase G1 et la synthèse d'ADN (Hayflick 1965). Selon le type de cellule impliqué, différents gènes ont été identifiés. En plus de ce blocage irréversible des cellules en phase G1, les cellules sénescents acquièrent une résistance à l'apoptose (Wang 1995) et leurs fonctions de différenciation sont altérées (Campisi 1996). Il a été proposé que ceci est à l'origine de l'accumulation de cellules ayant perdu leur capacité de division altérant l'expression des gènes et donc du phénotype menant finalement au déclin de la fonction et de l'intégrité des tissus caractéristique du vieillissement (Campisi 1997). Ce déclin est probablement en partie responsable des **changements dans l'expression des métalloprotéinases de la matrice (MMP)** lors du vieillissement.

Dans les cellules pré-sénescents, l'activité de la collagénase ou MMP-1 et de la stromélysine ou MMP-3, deux enzymes du derme clés dans la dégradation de la MEC, est très **faible**. Au contraire, les niveaux d'expression des inhibiteurs de la matrice TIMP-1 et TIMP-3 sont très élevés, réduisant encore plus la capacité de dégradation des MMP (Campisi 1996). Dans les cellules sénescents, en revanche, ce **phénomène est inversé**. De plus, les niveaux d'expression des gènes responsables de la biosynthèse du collagène sont réduits lors du vieillissement (West, Pereira-Smith, et Smith 1989; Millis et al. 1992; Wick et al. 1994). Ces changements font passer les cellules d'un phénotype « production de MEC » à un phénotype « dégradation de MEC » contribuant ainsi à la diminution et désorganisation du collagène classiquement observée lors du vieillissement (Uitto 1979).

A ces changements s'ajoute la réduction importante de l'expression des gènes de la synthèse d'élastine vers 40-50 ans et la disparition progressive du tissu élastique dans le

derme (Frances et Robert 1984). De nouveau, la capacité réduite de re-synthétiser ces fibres des cellules âgées se caractérise cliniquement par la perte d'élasticité de la peau, une autre particularité des peaux âgées (Braverman et Fonferko 1982).

I.3.2.1.d. Le stress oxydatif

L'hypothèse liant le vieillissement avec le stress **oxydatif** est de plus en plus répandue. Cette théorie, datant du début des années 90 suggère que le vieillissement est fortement influencé par des stress oxydatifs externes influençant la programme génétique à travers la **modulation de gènes redox sensibles** (Jenkins 2002).

L'organisme possède des enzymes capables de faciliter la consommation de l'oxygène mais également la détoxification de ses métabolites oxydés. En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais) sont bien plus toxiques que l'oxygène lui-même. Les ERO peuvent causer des dommages aux lipides (ils peuvent détruire les membranes riches en acides gras polyinsaturés), aux protéines ainsi qu'à l'ADN simple ou double brin entraînant alors des mutations et influencer la sénescence des cellules. Une étude montre en effet que de faibles quantités d' H_2O_2 peuvent provoquer l'entrée des cellules dans un état de sénescence, ce qui contribue probablement aux modifications de prolifération et de différenciation décrites précédemment (I.3.1.2.1.c.) (Chen et Ames 1994). De plus, les radicaux libres peuvent causer des **dommages aux tissus conjonctifs du derme, et en particulier au collagène mais aussi à l'élastine et à l'acide hyaluronique**. Les radicaux libres peuvent également générer des radicaux hydroxyles $\bullet OH$ qui sont des oxydants puissants pouvant attaquer tous les matériaux biologiques ainsi qu'altérer les fonctions enzymatiques en réagissant avec les résidus des sites actifs des enzymes.

L'épiderme de la peau possède une activité antioxydante très efficace et bien supérieure à la majorité des autres tissus (Kohen et Gati 2000). La réduction de cette efficacité antioxydante a été proposée comme un facteur du vieillissement de la peau. Cependant, le rôle de cette diminution d'activité dans le vieillissement est toujours soumis à controverses (Jenkins 2002). De nombreux travaux décrivent une diminution des enzymes antioxydantes dans la peau âgée comme la superoxyde dismutase (SOD) cuivre et zinc, la catalase et la glutathione peroxidase (Wei et al. 2001; Kohen et Gati 2000), mais d'autres suggèrent que le vieillissement de la peau n'est pas du au déclin de ses capacités antioxydantes (Lopez-Torres, Shindo, et Packer 1994). Cependant, tous sont d'accord pour dire que l'accumulation de radicaux libres au cours de la vie est très probablement à l'origine du vieillissement cellulaire puisque les mécanismes de piégeage des radicaux libres ne peuvent pas être à 100% efficaces à tous les stades de la vie.

I.3.2.2. Le vieillissement extrinsèque

I.3.2.2.a. Le photovieillissement

L'exposition de la peau aux UV est le facteur majeur lié au vieillissement extrinsèque. Ce phénomène de vieillissement de la peau par les rayonnements UV est appelé photovieillissement ou héliodermie et il a été suggéré que 80% du vieillissement cutané du

visage est due à l'exposition solaire (Gilchrest 1989). Cliniquement, une peau vieillie par le rayonnement solaire est caractérisée par une **perte d'élasticité, une sécheresse augmentée, une pigmentation irrégulière et des rides profondes** (Kligman et al. 1986). Même si les UV ont un impact important sur l'histologie de l'épiderme, avec notamment une augmentation ou diminution de son épaisseur (respectivement hyperplasie et atrophie sévère) et la perte de sa polarité, les conséquences majeures du photovieillissement s'observent au niveau du derme avec des **modifications dans la proportion et/ou fonctionnalité des composants extracellulaires dermiques** (Jenkins 2002).

Lors d'une exposition au soleil, les rayons UV B sont surtout absorbés par l'épiderme tandis que les UV A pénètrent plus profondément dans le derme. Les rayonnements UV ont plusieurs effets : ils peuvent agir sur la synthèse de fibres élastiques, sur la production des MMP, sur la réparation de l'ADN ou par l'intermédiaire des ERO.

Le signe histopathologique majeur du photovieillissement est l'accumulation massive de matériel « élastotique » dans le derme. On parle d'élastose solaire ou élastose actinique. Ce matériel comprend les composants classiques à l'origine des fibres élastiques mais leur organisation structurale et fonctionnalité sont sévèrement perturbées. Le mécanisme de formation de cette élastose solaire n'est pas encore clair mais il fait très probablement intervenir une dégradation des fibres élastiques existantes et une dysrégulation de la production d'élastine et de fibrilline (Jenkins 2002). La dégradation des fibres élastiques d'origine a été attribuée à l'augmentation de l'activité de l'élastase dermale due à l'infiltration de neutrophiles inflammatoires et des fibroblastes dermiques eux-même, en réponse à des radiations UV importantes (Labat-Robert et al. 2000). En plus de cette dégradation des fibres élastiques d'origine, les études suggèrent une augmentation de la synthèse de fibres élastiques dans une peau photo-abîmée mais le matériel produit est clairement dysfonctionnel et contribue fortement à la formation de masses amorphes typiques des peaux abîmées par le soleil (Bernstein et al. 1994; Bernstein et al. 1995; Werth et al. 1997; Uitto et Bernstein 1998). Le mécanisme de cette accumulation n'est cependant pas encore bien défini.

Une autre cause du vieillissement cutané lors d'une forte exposition aux UVs concerne l'expression des MMP. En effet, les MMP sont une famille vaste d'enzymes de dégradation (Matrisian 1992) dont 4 principalement sont impliquées dans la dégradation de la matrice dermique. Les actions combinées de la collagénase (MMP1), de la gélatinase 92 kDa (MMP2), de la gélatinase 72 kDa (MMP9) et de la stromelysine (MMP3) peuvent entièrement dégrader les fibres de collagène ainsi que les composants des fibres élastiques (Birkedal-Hansen 1987; Birkedal-Hansen et al. 1993). Or, si l'expression de ces enzymes est relativement faible dans la peau « normale », leur expression peut-être fortement augmentée sous l'effet des radiations UV, entraînant alors une dégradation significative des fibres de collagène (Stein et al. 1989; Petersen et al. 1992; Fisher et al. 1997).

Une exposition aux UV peut également induire des lésions au niveau de l'ADN (apparition de dimères de thymine par exemple) or, comme nous en avons parlé précédemment, lors du vieillissement intrinsèque, la capacité de l'organisme à réparer l'ADN diminue et des mutations s'accumulent, en particulier au niveau de l'épiderme et des fibroblastes. Ainsi, les lésions provoquées par les rayonnements UV ne seront pas (ou mal) réparées et peuvent alors entraîner des mutations, mort cellulaire ou être à l'origine d'une

carcinogénèse. De plus, des mutations ont été observées sur l'ADN mitochondrial dans les zones non protégées aux UV.

Lors du vieillissement intrinsèque, le système d'élimination des radicaux libres est diminué (cf I.3.2.1.d.). Il y a alors un déséquilibre entre production et élimination des radicaux libres et ce phénomène est accentué par l'exposition aux UV.

Pour finir, les UV diminuent la présence de récepteurs aux rétinoïdes entraînant ainsi une diminution des fonctions de la vitamine A. Ceci peut-être à l'origine du photovieillissement et de la carcinogénèse (Passeron et Ortonne 2003; Beylot et Martin 2007).

I.3.2.2.b. Le tabagisme

Les effets délétères du tabac sur la peau ont été décrits pour la première fois en 1856 (Solly 1856). Cependant, les altérations cutanées liées au tabagisme ne sont que peu étudiées, en particulier à cause de la difficulté à dissocier les effets dus spécifiquement au tabac et ceux dus au photovieillissement et vieillissement intrinsèque.

Les modifications induites par le tabac concernent surtout le derme. Tout d'abord avec la formation de liaisons covalentes entre les fibres de collagène, ce qui a pour conséquence d'accroître la tension maximale cutanée tolérée (jusqu'à rupture de la peau). Ce phénomène est appelé phénomène de « cross-linking » (Khayati 2009). Le tabac a également une activité élastinolytique avec une stimulation des MMP à l'origine de la destruction des fibres élastiques et la stimulation de la production de tissu élastique anormal (Saarialho-Kere et al. 1999; Lahmann et al. 2001).

De plus, il a été montré que la nicotine était à l'origine d'une augmentation de la vasopressine sérique qui est un vasoconstricteur puissant, induisant alors une diminution de la perfusion cutanée. C'est pour cette raison que l'on peut observer des retards à la cicatrisation chez de nombreux fumeurs.

L'absorption de la nicotine a également pour conséquence la diminution de la production d'œstrogènes. Cette carence pourrait expliquer l'effet synergique du tabac dans le vieillissement cutané des femmes en ménopause (Khayati 2009).

La consommation de tabac augmente la production de radicaux libres, augmentant ainsi le stress oxydant, les dommages à l'ADN et les effets délétères sur les fibres élastiques.

Le tabac est donc un facteur externe important dans le vieillissement cutané et la formation de rides. Il est à l'origine de l'apparition de rides précoces et leur accentuation, d'un amaigrissement du visage et d'un teint pâle ou jaunâtre.

I.3.2.2.c. La pollution atmosphérique

Le vieillissement cutané associé à la pollution atmosphérique est appelé « vieillissement environnemental ». Même si ce phénomène est difficile à individualiser du fait de la multiplicité des agents polluants, certaines observations ont pu être réalisées. Ainsi, une acidification de la peau a été mise en évidence. De même, ont été observés des troubles de l'hydratation, une modification des lipides de surface, augmentation de la desquamation. De plus, la couche cornée perd en souplesse et des crevasses peuvent apparaître.

De plus, la pollution par l'ozone entraîne une peroxydation des lipides de la bicouche membranaire des cellules de l'épiderme. L'ozone cause également la production de radicaux libres dans l'épiderme et la diminution de la production des vitamines C et E, molécules chargées de lutter contre la production des radicaux libres (Liebler, Kling, et Reed 1986; Cantarelli 2009).

1.3.2.3. Les modifications liées au vieillissement cutané

Les conséquences des perturbations induites par les processus décrits précédemment sur les différentes composantes cutanées sont mal connues dans le détail.

Au niveau de l'épiderme

Avec le vieillissement, le potentiel de différenciation des cellules épidermiques semble altéré (Kwon et al. 2008). La capacité de prolifération des kératinocytes et la progression des cellules vers la surface de l'épiderme diminuent, ce qui est à l'origine d'une diminution de l'épaisseur épidermique (Neerken et al. 2004). Il semble en outre que la capacité de restauration de la barrière lipidique soit également réduite chez le sujet âgé, chez lequel on observe en particulier une diminution des granulations lamellaires au niveau du *stratum granulosum* (Ghadially et al. 1995). De plus, on observe une diminution du nombre de mélanocytes (10 à 20 % par décennie dès 30 ans) une altération de l'unité épidermique de mélanisation provoquée par le dérèglement de la mélanogenèse, ce qui aboutit à l'apparition des tâches de sénescence, une diminution du nombre de cellules de Langérahans (jusqu'à 50% sur les zones exposées) ce qui entraîne une baisse de la réponse immunitaire ainsi qu'un ralentissement de la production de vitamine D.

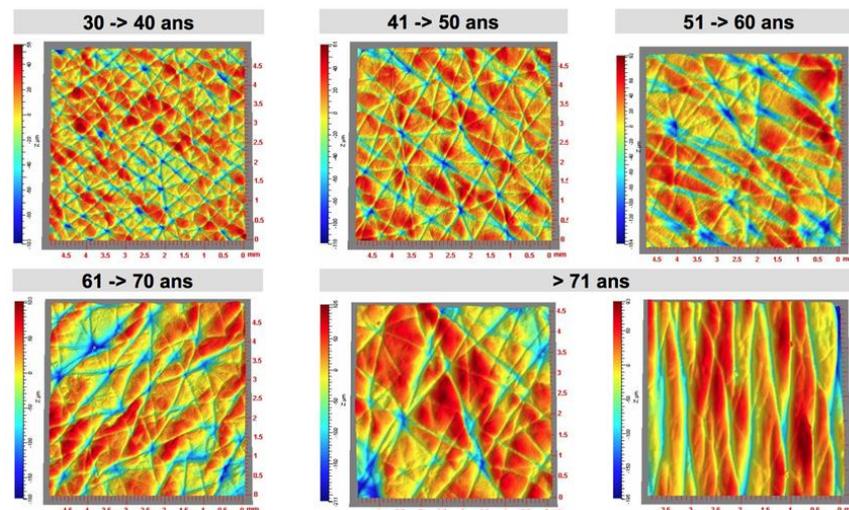


Figure 24 : Évolution des sillons primaires de la peau avec l'âge, mesurés grâce aux techniques de la tribologie (CNRS : Laboratoire de tribologie et dynamique des systèmes)

En plus de la diminution de la prolifération cellulaire, des signes plus spécifiques d'une dégénérescence sont observés: perte de la structure barrière, en particulier un fléchissement de la fonction barrière hydrique de la peau (Elias et Ghadially 2002), signes de dégradation intercellulaires et état de sécheresse cutanée (Fenske et Lober 1986). En effet, le

ralentissement du fonctionnement des aquaporines, transporteurs d'eau du derme vers l'hypoderme entraîne une diminution de l'hydratation de l'épiderme de 13 à 7% pour les peaux âgées. Le vieillissement de la peau est très visible au niveau du relief cutané. Certaines techniques offrent par exemple une image directe de l'état mécanique de la peau, notamment de son élasticité (Figure 24). Celles-ci mettent en évidence une désorganisation du relief cutané qui peut être due au vieillissement normal, mais aussi à des pathologies ou à des expositions trop fréquentes à des agents toxiques. On observe clairement que l'anisotropie (orientation des plis dans toutes les directions) décline avec l'âge (INSERM 2011).

Au niveau du derme

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il existe, dans la peau jeune, un équilibre métabolique entre synthèse et dégradation des constituants matriciels ce qui permet un renouvellement continu des tissus. Au cours du vieillissement, un déséquilibre se crée pour aboutir à la prépondérance du catabolisme au détriment de l'anabolisme (Bogdanowicz et Redoulès 2012). Cette situation est probablement la résultante de différents dysfonctionnements comme l'oxydation, la glycation ou la baisse de l'activité du protéasome. Ainsi, il a été montré qu'au cours du vieillissement, il existe des modifications structurales et fonctionnelles du derme. Ces modifications résultent de mécanismes complexes qui associent une diminution de la synthèse d'acide hyaluronique, de protéoglycannes (Carrino, Sorrell, et Caplan 2000), de collagènes de type I et III (Varani et al. 2006) et une altération de l'élastine (Uitto 1986). De plus, la taille et le nombre des fibroblastes diminuent, ce qui amène à une réorganisation de l'architecture du derme. L'augmentation de l'activité des protéases et en particulier l'activité des MMP et de l'élastase est également très largement décrite (Fligiel et al. 2003). Les conséquences de ces processus sont nombreuses : augmentation de la rigidité du réseau de collagène, diminution du volume matriciel, le tout retentissant sur les propriétés biomécaniques du derme à l'origine de la formation des rides. En effet, à partir de 20 ans, le derme perd en moyenne 1% de son collagène chaque année. Ayant pour rôle le soutien de la peau en assurant sa fermeté et son rebondi, les fibres de collagène se cassent et se raréfient avec l'âge. Ainsi, les tissus se relâchent et accentuent les signes visibles de vieillissement comme les rides. Les fibres de collagène ne jouent plus correctement leur rôle de maintien ; elles se rigidifient et deviennent moins souples et la peau perd de sa fermeté. (Fisher et al. 2009).

I.3.3. Les macroalgues, source de cosmétiques anti-âge ?

I.3.3.1. Le marché mondial des cosmétiques et dermo-cosmétiques

L'industrie des cosmétiques représente un chiffre d'affaire d'environ **170 milliards de dollars** et les prévisions s'accordent sur le fait que ce chiffre va continuer à augmenter, en particulier grâce au développement des classes moyennes dans de nombreux pays émergents, selon une analyse d'Eurostat (Wang et al. 2015).

La grande tendance actuelle en dermo-cosmétique est l'incorporation dans les produits cosmétiques de types crèmes, lotions ou pommades à usage local d'ingrédients tels que des vitamines, enzymes, peptides, antioxydants, facteurs de croissance... qui peuvent délivrer des

nutriments et influencer les fonctions biologiques afin de d'améliorer la santé de la peau. Un mot anglais a été créé afin de décrire ce type de produits : les « **cosmeceuticals** », qui décrit bien des produits à l'interface des « cosmetics » et « pharmaceuticals » (Kligman 2000). L'avantage de ces produits pour les industriels est qu'ils offrent un risque moins important ainsi qu'un retour sur investissement potentiel plus rapide en comparaison avec le marché pharmaceutique à haut risque et haute valeur ajoutée (Balboa et al. 2015). Le marché des « cosmeceuticals » est en forte expansion, répondant à la demande des consommateurs de produits de plus grande efficacité. Les « cosmeceuticals » sont aujourd'hui le segment de l'industrie cosmétique présentant la croissance la plus rapide et le nombre de produits introduits chaque année sur le marché dépasse celui des produits pharmaceutiques (Kligman 2000). Même si ce concept est assez récent, il existe environ 400 fabricants et fournisseurs de produits « cosméceutiques ». Des croissance entre 4 et 25% et 4 et 10% ont été constatées pour les périodes 2002-2007 et 2007-2012 pour ces produits, avec une place prépondérante des produits anti-âge (Brandt, Cazzaniga, et Hann 2011; Balboa et al. 2015).

Il existe aujourd'hui différentes molécules actives contre le vieillissement cutané que l'on peut ranger par grandes catégories d'actions anti-âge.

- des **molécules pures** utilisées comme **tenseurs et hydratants** comme l'acide hyaluronique pur, le chitosane, l'élastine, le collagène ;
- des molécules utilisées comme **agents de desquamation** comme les α -hydroxyacides, les rétinoïdes ;
- des molécules utilisées comme **anti-radicaux libres** comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, le nicotinamide, le coenzyme Q10, le sélénium et d'autres molécules comme des extraits de thé, des extraits de pépin de résin, de ginkgo biloba ou de soja par exemple ;
- des **stimulants cellulaires** tels que les stimulants de la production de collagène (comme des substances d'origine synthétique tels que le Collagen Potentiating Peptide CPP ou le Biopeptide CL), des stimulants de la synthèse d'élastine (comme le synthétique biopeptide EL), les glycoprotéines, le rétinol ;
- des molécules **actives sur le maintien de l'équilibre de la peau** comme les anti-glycations (flavonols, L-lysine et L-arginine), les anti-élastases (peptides synthétiques biomimétiques ou extraits naturels provenant de cartilages de poisson, d'extraits végétaux comme les mûres ou feuilles de vigne), et les inhibiteurs de MMP.

1.3.3.2. Un besoin accru pour des produits naturels

Malgré ce futur prometteur, la recherche sur les produits cosmétiques doit se diriger vers l'un des domaines aux plus hauts potentiels de l'industrie cosmétique actuelle, c'est-à-dire l'utilisation de produits naturels dans les formulations. En effet, les consommateurs sont de plus en plus méfiants quant à l'utilisation de produits chimiques dans les produits cosmétiques et les besoins se redirigent vers des formulations contenant des produits fondamentaux, naturels. La demande pour des produits naturels et respectueux de l'environnement est ainsi en forte augmentation.

Parmi ces produits naturels, ceux d'origine marine ont une place de choix car ils représentent toujours une ressource sous-exploitée de composés présentant une grande diversité et bénéficiant d'une image très positive pour le consommateur (de Vries et Beart 1995; Aneiros et Garateix 2004; Balboa et al. 2015). Certains ingrédients d'origine marine sont déjà utilisés depuis plusieurs années dans les produits cosmétiques comme la gélatine et collagène du poisson, la chitine et chitosan des crustacés ou coraux, les alginates et carraghénanes des macroalgues brunes et rouges ainsi que des boues et sels marins (Kim et al. 2008).

Les extraits de macroalgues peuvent être utilisés en cosmétiques de deux façons différentes : soit comme **excipient** dans la formulation du cosmétique (c'est-à-dire comme stabilisant ou émulsifiant), soit comme **agent thérapeutique** directement (Kim et al. 2008; Agatonovic-Kustrin et al. 2013; Wang et al. 2015; Bedoux et al. 2014).

Les produits dermo-cosmétiques contenant des extraits de macroalgues utilisés actuellement comme agents thérapeutiques peuvent-être classés en 4 grandes catégories selon leur action : les extraits possédant une activité **anti-âge**, les produits utilisés pour blanchir la peau (largement utilisés, en particulier en Asie), les extraits présentant des propriétés anti-microbiennes et les extraits ayant des propriétés hydratantes.

Ainsi, de plus en plus de marques possèdent une gamme de dermo-cosmétiques « anti-âge » contenant des actifs plus ou moins purifiés extraits d'algues ou, directement, l'algue broyée comme, par exemple,

- L'acide algonique, un exo-polysaccharide produit par des micro-algues a été intégré dans une gamme anti-âge de chez Algenist.
- La synergie micro-algue bleu-vert et macroalgue dorée de chez Biotherm. La première possède une action « rétinol-like » sur la régénération de la peau, la seconde stimule la synthèse des composants du derme.
- Les exopolysaccharides de micro-algues de Phytomer stimulant la production de collagène, acide hyaluronique et élastine
- Un extrait d'algues bleues de Galénic permettant d'agir sur les microvaisseaux dermiques et sur la synthèse d'acide hyaluronique, de collagène et d'acide hyaluronique.
- Un mélange de *Tetraselmis*, une microalgue verte et d'une macroalgue de Daniel Jouvance. Il stimule le renouvellement cellulaire et l'hydratation.
- Un mélange constitué de différentes macroalgues de La Prairie ayant une activité antioxydante et agissant sur l'hydratation.
- La biofermentation de la macroalgue brune *Macrocystis pyrifera* ayant une action cicatrisante de Crème de la Mer.

1.3.3.2. Les macroalgues, source de molécules anti-âge

i) Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, ou polyphénols représentent un groupe de composés structurellement divers comprenant un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles et varient de la simple molécule phénolique au composé hautement polymérisé.

Ces composés sont les plus largement étudiés comme anti-oxydants chez les macroalgues. Ainsi, des polyphénols extraits de macroalgues brunes comme *Scytosiphon lomentaria*, *Ecklonia cava*, *Sargassum horneri*, *Hizikia fusiformis*, *Fucus vesiculosus* (Fitton 2015) ont montré des activités anti-oxydantes intéressantes.

Un groupe de polyphénols, les **phlorotannins**, qui sont des polymères de phloroglucinol et qui ont été identifiés chez plusieurs familles de macroalgues comme les Alariaceae, les Fucaceae et les Sargassaceae, ont montré des activités anti-oxydantes très intéressantes, meilleures que celles de la plupart des autres polyphénols d'algues. Plusieurs études ont montré leur capacité à protéger les cellules contre le stress photo-oxydatif induit par les UV B (Connan et al. 2006; Zubia, Robledo, et Freile-Pelegrin 2007; Dutot et al. 2012; Wang et al. 2012). Cette forte activité est probablement due à leur squelette moléculaire unique, l'activité antioxydante des polyphénols étant largement liée aux cycles phénol présents, qui agissent comme pièges à électrons pour les espèces réactives oxygénées.

En plus de leur activité anti-oxydante, certains polyphénols ont montré une activité inhibitrice des MMP, à l'origine d'une diminution de la dégradation des composés de la MEC. La régulation de la transcription de MMP-1 est dépendante du facteur de transcription AP-1 (activator protein 1) en coopération avec le facteur nucléaire NF- κ B. Une étude de 2006 réalisée sur 29 extraits de macroalgues a montré que 3 extraits de macroalgues de l'espèce Alariaceae : *Eisenia bicyclis*, *Ecklonia cava* et *Ecklonia stolonifera* avaient la capacité d'inhiber l'activité de AP-1 et NF- κ B ceci étant corrélé à l'inhibition de l'expression de MMP-1. Deux composés ont particulièrement attiré l'attention des chercheurs : l'eckol et le dieckol deux phlorotannins extraits des macroalgues des espèces *Ecklonia* (Joe et al. 2006). Une étude réalisée sur le dieckol et eckol isolés d'*Ecklonia stolonifera* en 2013 confirme ces résultats, les extraits inhibant l'expression de MMP-1 dans des fibroblastes de peau humaine *in vitro*. Cette étude conclut également que ces deux phlorotannins inhibent les protéines et l'expression des gènes de MMP-1, MMP-3 et MMP-13 dans des cellules humaines d'ostéosarcome. Ils sont également capables d'inhiber la formation des ERO et de bloquer la cytokine (Thomas et Kim 2013; Wang et al. 2015).

ii) *Les polysaccharides sulfatés*

En plus des composés phénoliques, certains polysaccharides de macroalgues ont également des activités anti-oxydantes. En effet, des polysaccharides comme les laminaranes, fucoïdanes et alginates extraits des macroalgues brunes *Fucus vesiculosus* ou *Turbinaria conoides* ou les carraghénanes de macroalgues rouges comme *Gracilaria* ont montré leur potentiel comme anti-oxydants (Pilar Rupérez, Ahrazem, et Leal 2002; Rocha de Souza et al. 2007; Wang et al. 2008; Chattopadhyay et al. 2010; Souza et al. 2012).

Récemment, il a également été montré que des fucoïdanes étaient capables d'inhiber l'expression de MMP-1 *in vitro* par la suppression des kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK), inhibant la régulation à la baisse de la synthèse de procollagène I (Moon et al. 2009). De plus, dans les cellules traitées par des fucoïdanes, l'expression de l'ARNm de MMP-1 était significativement réduite. Un autre travail a montré qu'un fucoïdane

de 16 kDa était capable d'inhiber l'induction de MMP-3 sur des fibroblastes dermiques humains. Des études *ex vivo* sur ce même polysaccharide ont montré que celui-ci était capable de réduire l'activité élastase de leucocytes, résultant en une protection des fibres élastiques contre la protéolyse enzymatique (Senni et al. 2006). Une étude de 2013 a montré qu'un galactofucane isolé de la macroalgue brune *Saccharina longicuris* et soumis à une dépolymérisation radicalaire avait la capacité de modifier la croissance cellulaire de fibroblastes ainsi que la synthèse de MMP et de collagène de type I. Dans cette étude, les galactofucanes bruts et dépolymérisés influencent la croissance des fibroblastes, l'apoptose et la synthèse des MMP et du collagène en fonction de leur poids moléculaire (Rioux et al. 2013).

iii) *Les acides aminés de type mycosporine*

Certaines macroalgues ont développé des mécanismes permettant de contrer les effets délétères des rayonnements UV en produisant des composants ayant la capacité d'absorber les UV, agissant ainsi comme écran solaires, appelés Acides Aminés de type Mycosporine (AMM, en anglais MAA mycosporine-like amino acids). Les AMM sont donc des composés bioactifs prometteurs qui peuvent protéger les fibroblastes de la mort cellulaire due aux UV et restreindre le photovieillissement (Dunlap et Yamamoto 1995; Bhatia et al. 2011). Ces métabolites secondaires sont retrouvés en particulier dans les macroalgues rouges comme *Porphyra umbilicalis* ou *Porphyra rosengurttii* (Conde, Churio, et Previtali 2000).

iv) *Le stérol*

Une étude de 2013 sur du fucostérol, un stérol naturel extrait de macroalgues brunes a montré que celui-ci était à l'origine d'une augmentation de la production de procollagène I en diminuant la production et expression des MMP sur des cellules HaCaT (kératinocytes) soumises à des UVA (Kim et al. 2013).

v) *Les peptides*

Assez peu d'études ne portent actuellement sur l'effet anti-âge de protéines ou peptides extraits de macroalgues qui sont pourtant des sources intéressantes de ces composés. Une étude de 2013 a mis en évidence le pouvoir anti-oxydant de certains hydrolysats de protéines préparés à partir de différentes espèces de macroalgues comme *Enteromorpha prolifera*, *Palmaria palmata*, *Undaria pinnatifida*, *Porphyra yezoensis* ou *Sargassum sp.*

Un biopeptide extrait de la macroalgue verte *Ulva lactuca* est actuellement utilisé en cosmétique. Ce polypeptide, appelé peptide Aosa, est composé de valine, lysine, glycine, arginine et acide aspartique et présente une structure proche à celle de l'élastine. Une étude a montré qu'un tripeptide arginine-glycine-acide aspartique était à l'origine d'une augmentation de la biosynthèse de collagène I dans les fibroblastes humains en agissant sur le facteur de croissance tissulaire stimulant le mécanisme de production du collagène (Brevet WO2005007126 A1).

Etude bibliographique

Tableau VI : Applications cosmétiques de composés dérivés d'algues d'après (Agatonovic-Kustrin et Morton 2013)

Composé bioactif	Fonction potentielle en cosmétique	Autres utilisations
Terpénoïdes	Photo-dommages, photo-vieillessement	
Caroténoïdes	Filtre UV, renouvellement des cellules de l'épiderme, antioxydant, contrôle de la flore bactérienne cutanée	
Tocophérol	Protection UV	
Composés phénoliques	Protection UV	
Fucoïdanes	Anti-âge, anti-ride	Anti-viral, anti-inflammatoire, Anti-coagulant, Anti-tumoral
Carraghénanes	Gélifiant et épaississant	Anti-tumoral, Anti-coagulant, Immunomodulateur, anti-hyperlipidémique, induction de l'inflammation et anti-viral
Alginates	Masques de visage et nettoyant corps, réparation de la peau, hydratation, gélifiant, stabilisant	
Agars	Gélifiant, émulsifiant	Agent-gonflant, laxatif, anti-coagulant, antioxydant
Acides gras insaturés	Anti-âge, filtre UV, anti-ride, régénérant, hydratation	Anti-inflammatoire
Acides aminés de type mycosporine	Filtre UV	

III. RESULTATS

PARTIE A : Etude de l'activité anti-coagulante
d'extraits aqueux de macroalgues

A.1. Introduction

L'héparine, polysaccharide sulfaté extrait de muqueuses de mammifères (extraite d'intestins de porcs en majorité ou de poumon de bœuf), est l'agent anti-thrombotique le plus utilisé dans la prévention et le traitement des pathologies thromboemboliques (rapport ANSM 2014). Cependant, au cours des traitements par l'héparine non fractionnée (NF), il peut survenir des effets secondaires tels qu'une réaction allergique, ou une complication hémorragique due à sa très forte activité anticoagulante, Xa- et IIa-dépendante. En raison des limites d'utilisation thérapeutique de l'héparine NF, de sa faible biodisponibilité et des risques potentiels de transmission d'agents non conventionnels (c'est-à-dire les prions), il est important de pouvoir disposer de nouveaux polysaccharides d'origine non mammalienne efficaces dans la lutte contre les pathologies thromboemboliques (Oreste et Zoppetti 2012).

De nombreuses publications attestent du potentiel des polysaccharides sulfatés extraits de macroalgues en termes d'activité anticoagulante. En effet, leur structure, et en particulier la présence des groupements sulfates ainsi que des acides uroniques, leur permet de posséder des propriétés héparino-mimétiques.

L'objectif de cette partie sera d'étudier des biomasses macroalgales afin d'identifier les espèces les plus intéressantes en termes d'activité anti-coagulante. Les macroalgues seront choisies en fonction de leur disponibilité et facilité de production sur les côtes françaises. De plus, ce sont toutes des algues comestibles. L'intérêt de travailler sur des algues autorisées en consommation humaine est que leur non toxicité a déjà été démontrée et acceptée. Les macroalgues choisies pour cette étude sont *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus*, *Himantalia elongata*, *Ascophyllum nodosum* pour les algues brunes, *Chondrus crispus* pour les algues rouges et *Ulva sp.* pour les algues vertes.

Les algues présentant alors le potentiel le plus intéressant en termes d'activité anti-coagulante pourront ensuite être soumises au procédé de la société SEPROSYS afin d'extraire et de purifier les polysaccharides sulfatés à l'origine de l'activité anti-coagulante des extraits aqueux.

- La première sous-partie de cette étude portera sur le criblage de biomasses macroalgales. Afin que la sélection soit rapide, les algues seront soumises à une extraction aqueuse, qui est une méthode simple et peu coûteuse pour extraire les polysaccharides sulfatés mais qui ne leur est cependant pas spécifique puisque d'autres composés hydrosolubles, comme les protéines, par exemple, sont co-extraits. La composition biochimique des extraits sera ensuite étudiée avant qu'ils ne soient testés pour leur activité anti-coagulante. Deux types de tests seront utilisés : des tests enzymatiques, spécifiques des deux enzymes centrales de la coagulation, le facteur Xa et le facteur IIa (thrombine), et des tests de coagulométrie ciblant une activité plus large, sur les trois voies principales de la coagulation *in vitro*. Les activités anti-coagulantes seront comparées à celles d'une héparine non fractionnée (HNF) et d'une héparine de bas poids moléculaire (HBPM), le Lovenox[®], deux anti-coagulants commerciaux utilisés en thérapeutique.



Figure 25 : Espèces d'algues étudiées dans la partie A.1.

- Dans la deuxième sous-partie, les macroalgues dont les extraits aqueux sont les plus intéressants en termes d'activité anti-coagulante seront soumises au procédé SEPROSYS[®] afin de purifier les polysaccharides sulfatés. Une fois purifiés, les polysaccharides seront analysés pour leur potentiel comme anti-coagulants par les tests de coagulométrie. De plus, afin de mieux comprendre la relation structure/fonction des ulvanes et de leur activité anti-coagulante, une sulfatation chimique sera réalisée sur l'ulvane extrait par la méthode SEPROSYS[®] et l'activité anti-coagulante des ulvanes sera mesurée avant et après sulfatation.

A.2. Evaluation de l'activité anti-coagulante d'extraits aqueux de macroalgues comestibles françaises

Résumé

Des extraits aqueux de macroalgues brunes (*Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus*, *Himantalia elongata*, *Ascophyllum nodosum*), verte (*Ulva lactuca*), et rouge (*Chondrus crispus*), ont été produits. Après avoir caractérisé les extraits en termes de composition biochimique, ceux-ci ont été testés pour leur activité anti-coagulante, et ceci par deux tests *in vitro* ayant des cibles différentes ; tout d'abord un test enzymatique, ciblant l'activité des polysaccharides sur les deux enzymes clé de la coagulation : le facteur Xa et le facteur IIa (thrombine), avec ou sans présence d'un inhibiteur classique de leur activité (antithrombine). Aujourd'hui, l'activité anti-coagulante de la plupart des anti-coagulants commerciaux est exprimée en fonction de leur activité sur ces deux enzymes. L'autre méthode est plus globale, elle ne cible pas une enzyme spécifique mais l'activité des extraits sur les trois grandes voies de la coagulation *in vitro* : la voie extrinsèque (test TCA ou aPTT en anglais), la voie intrinsèque (TP ou PT en anglais) et la voie commune de la coagulation (TT). Ces derniers tests sont réalisés par coagulométrie sur du plasma humain. Les résultats d'activité ont été comparés à celle de deux anti-coagulants commerciaux : une héparine non fractionnée (HNF) et le Lovenox[®], une héparine de bas poids moléculaire sous forme de sel de sodium.

Les extraits aqueux de *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* et *Chondrus crispus* montrent une activité significative sur la voie intrinsèque et/ou commune de la coagulation par le test TCA (ou APTT), seulement cinq fois inférieure à celle du Lovenox[®] qui est pur.

L'ensemble de ces résultats est regroupé dans un article sous le titre « Comparative study on the anticoagulant activities of edible macroalgae aqueous extracts » qui a été accepté dans Natural Product Research.

Comparative study on the anticoagulant activities of edible macroalgae aqueous extracts

Amandine Adrien^{1,2}, Nicolas Bridiau^{1*}, Delphine Dufour², Stanislas Baudouin², Thierry Maugard¹

¹ Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSS, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

² SEPROSYS, Séparations, Procédés, Systèmes, 12 Rue Marie-Aline Dusseau, 17000 Rochelle, France.

**Author for correspondance (Address: Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSS, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. Fax: +33 546458277; E-mail: nicolas.bridiau@univ-lr.fr)*

Abstract:

Objectives The aim of this study was to evaluate the potential anticoagulant activity of different sulfated polysaccharide-containing extracts from six french edible macroalgae.

Methods Aqueous extracts from brown (*Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus*, *Himanthalia elongata*, *Ascophyllum nodosum*), green (*Ulva lactuca*), and red (*Chondrus crispus*) macroalgae, were prepared and the biochemical composition of each extract was determined, including major biomolecules composition, sulfate and ash contents. The potential anticoagulant activity of each extract was also investigated using different scales, from the specific antithrombin-dependent pathway (anti-Xa and anti-IIa) to the intrinsic and/or common (Activated Partial Thromboplastin Time, APTT), extrinsic (Prothrombin Time, PT) or common (Thrombin Time, TT) anticoagulant pathways. Furthermore, the anticoagulant properties of the extracts were compared with those of commercial anticoagulants, heparin and Lovenox[®].

Key findings The extracts from *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* and *Chondrus crispus* showed a significant APTT anticoagulant capacity, only five-fold lower than that of Lovenox[®], which is a pure low molecular weight heparin used as an anticoagulant agent to prevent pulmonary embolism in patients undergoing surgery, or medical patients with severely restricted mobility during acute illness.

Conclusions This study showed that three french edible macroalgae extracts exhibited a potent anticoagulant capacity, mainly targeting the intrinsic and common pathways of the coagulation cascade.

Keywords: aqueous extracts, edible macroalgae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Chlorophyceae, anticoagulant activity

Introduction

Macroalgae have been consumed or used in traditional medicine for centuries and were already perceived as a food with great health benefits (Jiao et al. 2011). Since then, several studies have shown that macroalgae are capable of synthesizing a wide range of key nutrients such as proteins, minerals and fibers (Lahaye 1991; Mabeau et Fleurence 1993; Fleurence 1999). Macroalgae are also an important source of polysaccharides, such as sulfated polysaccharides, which account for many of their biological activities including anticoagulant (Carlucci et al. 1997; Chevotot et al. 1999; Matsubara 2004; Majdoub et al. 2009; Jin et al. 2013; Kim et Wijesekara 2011), immuno-inflammatory (Granert et al. 1994; Jiao et al. 2011; Mohamed, Hashim, et Rahman 2012), antiviral (Damonte, Matulewicz, et Cerezo 2004; Jiao et al. 2011; Pujol et al. 2012; Rabanal et al. 2014; Witvrouw et De Clercq 1997), or antioxidant (Pilar Rupérez et al. 2002; Rocha de Souza et al. 2007; Costa et al. 2010) properties that might find relevance in nutraceutical, pharmaceutical and cosmeceutical applications.

Sulfated polysaccharides quantity and quality differ among the three major divisions of macroalgae: Phaeophyceae (brown algae), Rhodophyceae (red algae), and Chlorophyceae (green algae).

Fucoïdians are the major sulfated polysaccharides of Phaeophyceae. They can be classified into two main groups (Ushakova et al. 2009), one including fucoïdians isolated from macroalgae such as *Laminaria digitata*, which have their central chains composed of (1→3)-linked α -L-fucopyranose residues, and a second group of fucoïdians isolated from *Ascophyllum nodosum* and *Fucus* species, which have their central chains composed of repeating (1→3)- and (1→4)-linked α -L-fucopyranose residues (Jiao et al. 2011).

Rhodophyceae possess sulfated polysaccharides called carrageenans which are galactans with 4-linked α -galactose residues of the D-series (Jiao et al. 2011). There are more than 15 different carrageenans structures which are classified based on their chemistry. They have been extensively used in the food industry as thickening, gelling and protein-suspending agents. Furthermore, carrageenans are characterized by a number of biological activities related to immune-inflammatory responses, and anti-viral activities as they are potent inhibitors of herpes virus and human papillomavirus (Campo et al. 2009).

Ulvans are the major sulfated polysaccharides of Chlorophyceae. They are composed by a majority of rhamnose and uronic acids (glucuronic or iduronic acid) (Percival et McDowell 1967; Lahaye et Robic 2007). The main repeating disaccharide units of ulvans are $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-l-Rhap3S-(1}\rightarrow]_n$ and $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-l-Idop-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-l-Rhap3S-(1}\rightarrow]_n$ (Jiao et al. 2011). Different studies have suggested that ulvans possess interesting biological activities such as immune modulation, anti-viral and anticoagulant activities (Lahaye et Robic 2007).

Heparin belongs to the glycosaminoglycan (GAG) family of polysaccharides. Its precursor is characterized by a linear chain of a disaccharide unit of N-acetyl-d-glucosamine bound to a D-glucuronic acid (GlcNAc1–4GlcA1–4). Unfractionated heparin (UFH) has an average molecular weight of 15 kDa (Sommers et al. 2011). Despite its major anticoagulant activity, which is anti-thrombin dependant (Mulloy, Hogwood, et Gray 2010), heparin can cause serious adverse events such as thrombocytopenia (heparin-induced thrombocytopenia or HIT) (Warkentin et al. 1995) or hemorrhage (Da Silva et Sobel 2002). Moreover, its low

bioavailability (Emanuele et Fareed 1987) makes such a treatment really expensive. To reduce the risks of adverse events, heparin can be depolymerized to produce smaller molecules, known as low-molecular-weight heparins (LMWH, MW_{avg} ≥ ~6 kDa) (Hao et al. 2011). Lovenox[®], for instance, is the commercial name of enoxaparin sodium, is a LMWH used for prevention and treatment of deep vein thrombosis or pulmonary embolism. Although LMWH reduce significantly the risks of pathologies associated with an anticoagulant treatment compared to UFH, they still represent the leading cause of mortality, ahead of cancer (Sattari et Lowenthal 2011). Given the risks and high costs of these treatments, there is a compelling need for further investigation of new sources of anticoagulants.

Several macroalgal polysaccharides have been studied for their anticoagulant activity. The relationship between polysaccharide chemical structure and anticoagulant activity is unclear but previous studies have shown that several factors such as the molecular weight, osidic composition, and sulfate content and position may significantly affect the anticoagulant activity (Barros Gomes Camara et al. 2011; Jin et al. 2013). The mechanisms underlying macroalgal sulfated polysaccharide-induced anticoagulant activity are not fully understood. Direct anticoagulant activity (antithrombin-independent pathway) has been observed in several species of brown algae, including *Laminaria brasiliensis* and *Fucus vesiculosus* (Grauffel et al. 1989; Pereira, Mulloy, et Mourão 1999), or in the green algae *Ulva conglobata* (Mao et al. 2006), in contrast with a very low activity for other fucans such as sulfated polysaccharides from *Ecklonia kurome* (Nishino, Aizu, et Nagumo 1991a). The mechanisms of antithrombin or heparin cofactor II mediated activities have also been studied and this type of activity has been reported for sulfated polysaccharides from different brown algae species, including *Fucus vesiculosus*, *Pelvetia canaliculata* or *Ascophyllum nodosum* (Church et al. 1989; Collicet et al. 1991; Mauray et al. 1995). While an anti-factor Xa activity has also been reported for some specific seaweed polysaccharides (Church et al. 1989), some studies have found contradictory results (Collicet et al. 1991; Pereira, Mulloy, et Mourão 1999).

In this study, aqueous extracts were prepared from six macroalgae, including brown (*Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Himanthalia elongata*), red (*Chondrus crispus*) and green (*Ulva lactuca*) algae and their anticoagulant activity was assessed by monitoring the specific antithrombin-dependent pathway (anti-Xa and anti-IIa), the intrinsic and/or common (Activated Partial Thromboplastin Time: APTT), extrinsic (Prothrombin Time: PT), and common (Thrombin Time: TT) anticoagulant pathways. All of the studied edible macroalgae are widespread along the French coast and represent an inexpensive source of algal biomass for research. Aqueous extraction was a good exploratory method to isolate sulfated polysaccharides from macroalgae. This method is eco-friendly, fast and cheap and provides preliminary data on the most interesting polysaccharides-rich seaweeds extracts in terms of anticoagulant activity.

Materials and methods

Material

Six seaweed species, including four brown macroalgae (*Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Himantalia elongata* and *Laminaria digitata*), one red macroalga (*Chondrus crispus*), and one green alga (*Ulva lactuca*) were purchased from Aleor, France. *Ulva lactuca* was bought as flakes of 0.5/2 mm, and all the other seaweed samples were purchased as micronized algal powder. Except when mentioned, all chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich France.

Preparation of the seaweed extracts

Twenty-five grams of each algal powder were resuspended in 1 L of water and the mixture was incubated at 80°C for 2 hours under continuous stirring at 800 rpm. The mixture was roughly filtered to remove most of the algae residues and centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes at 20°C. The supernatants were concentrated by freeze-drying, redissolved in water at the concentration of 10 mg/mL, and dialyzed in cellulose membrane tubing (molecular weight cut-off, 1000 Da) against water, at 4°C for 3 days. The extracts were then freeze-dried and stored at 4°C until further analysis.

Composition analysis

Neutral sugar content was determined according to the phenol-sulfuric method (Dubois et al. 1951) using anhydrous D-glucose as a standard. Uronic acid content was determined using the modified m-hydroxy-diphenyl-sulfuric acid method of Filisetti-Cozzi et al (Filisetti-Cozzi et al. 1991) with D-glucuronic acid as standard. Protein content was determined using the bicinchoninic acid assay (Smith et al. 1985) with bovine serum albumin as standard. Sulfate content was obtained by the method of Jaques et al. using 3-amino-7-(dimethylamino)phenothiazin-5-ium chloride (Azure A), which binds the sulfated groups in a polysaccharide chain (Jaques et al. 1968; Gao et al. 2003).

Ash content was quantified by measuring the mass loss of samples after 15 h of heating at 550°C.

Assays of antithrombin-mediated inhibition of factors Xa and IIa (thrombin)

Stachrom ATIII and Stachrom Heparin kits (Stago, France) were used to evaluate the antithrombin-mediated inhibition of factors Xa and IIa (thrombin), respectively. Antithrombin, factor Xa, thrombin, and the substrates were prepared according to the manufacturer's instructions. Antithrombin was then diluted 1:2 in the kit buffer at 1:10. Then 25 µl of seaweed extract aqueous solution at various concentrations were incubated with 25 µL of antithrombin (0.626 µg/µL) at 37°C for 30 seconds. Thereafter, 25 µL of factor Xa or factor IIa (thrombin) (11.25 nKat/mL) were added. After 30 seconds of incubation, 25 µL of a 3.25 nM solution of the factor Xa chromogenic substrate (CBS 31.39; CH₂-SO₂-D-Leu-Gly-Arg-pNA, AcOH) or 25 µL of a 1.4 nM solution of the factor IIa chromogenic substrate (CBS 61.50; EtM-SPro-ARG-pNA, AcOH) were added. Factor Xa or IIa (thrombin) activities were measured at 405 nm every 6 seconds for 5 minutes. The initial velocity was calculated as the

slope of the linear segment of the kinetic curve. All assays were performed in 96-well NUNC microplates using a Fluostar Omega microplate reader.

Clotting time assays

The anticoagulant activity of the different extracts was determined by measuring the APTT, PT or TT. All the assays were carried out using a Start4 coagulometer and assay kits from Stago (France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 90 μL of normal human plasma (Stago, France) were mixed with 10 μL of a 0.9% NaCl solution containing various amounts of samples for each assay. For the APTT assay, 100 μL of APTT assay reagent were then added to the mixture prior to incubation for 3 min at 37°C and 100 μL of 0.025 M CaCl_2 were added. The clotting time (APTT) was recorded. For TT and PT assays, the mixture was first incubated for 2 min (PT) or 1 min (TT) at 37°C, before adding 200 μL of PT assay reagent (PT) or 100 μL of TT assay reagent (TT) and recording the clotting time (PT or TT). The negative control used in all the assays was 0.9% NaCl solution. Analyses were also carried out on heparin sodium salt 12865E (batch: 201274) which was purchased from Interchim (Montluçon, France) and Lovenox[®] which was kindly provided by the hospital of La Rochelle, France.

Statistical analysis

All analyses were performed at least in triplicate giving standard error values systematically lower than 10% of the mean value.

The extract concentrations inhibiting 50% of the residual activity of coagulation factors Xa or IIa (IC_{50}), as well as the extract concentrations enabling to double the clotting time of the negative control (NaCl 0.9%) during clotting time assays APTT, PT or TT, were determined by fitting the inhibition data to a 5 parameters rational equation using nonlinear least-squares regression analysis in Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, USA).

Results

Biochemical analysis

Prior to evaluate the anticoagulant activity of the six polysaccharide-rich seaweed extracts that were chosen, from the brown macroalgae *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Himanthalia elongata* and *Laminaria digitata*, the red macroalga *Chondrus crispus*, and the green alga *Ulva lactuca*, we analyzed their biochemical composition (table 1)

The aqueous extraction process generated seaweed extracts containing 16-25.5% of total neutral sugars. Protein content was very variable from a sample to the other. The protein content of *Ulva lactuca* extract was the lowest, 2.9%, while the protein content of *Ascophyllum nodosum* extract was by far the most important of all the extracts, 57%. The protein content of *Fucus vesiculosus* extract was also high, with 37%. Furthermore, the uronic acid content of each extract, which could be an interesting feature for the anticoagulant activity as it is a common characteristic with heparin, has been measured. The uronic acid content of the extracts varies from 2.3 to 19.4%. The extracts of *Himanthalia* and *Laminaria*

contain the highest quantity of uronic acid, with 19.4 and 14.05% respectively, followed by the extracts from *Ascophyllum nodosum*, *Ulva lactuca* and *Fucus vesiculosus* with an uronic acid content around 8-9%. The proportion of sulfate groups on the sugar backbone was relatively low overall, and particularly for the *Laminaria digitata* extract, which exhibited the lowest degree of sulfation (3.5%). In contrast, *Ulva lactuca* and *Himanthalia elongata* had the highest degrees of sulfation (12.9% and 12.8%, respectively), indicating a potential anticoagulant activity in these extracts.

Table 1. Chemical composition of the seaweed extracts (dw%)

Seaweed extract	Ash (%)	Protein content (%)	Neutral sugar content (%)	Uronic acid content (%)	Sulfates on the sugar backbone (%)
<i>Himanthalia elongata</i>	14.1	13.7	16	19.4	12.8
<i>Laminaria digitata</i>	7.3	8	21	14.1	3.5
<i>Ascophyllum nodosum</i>	8.3	57	19.1	9.2	6.1
<i>Ulva lactuca</i>	21.3	2.9	25.5	8.9	12.9
<i>Fucus vesiculosus</i>	9.6	36.9	16.4	7.9	7.9
<i>Chondrus crispus</i>	13.5	14.4	19.2	2.3	9.4

Anticoagulant activity of the seaweed extracts

The anticoagulant activity of the seaweed extracts was assessed using different scales and pathways of the coagulation cascade (Figure 1), using heparin and Lovenox[®] as references.

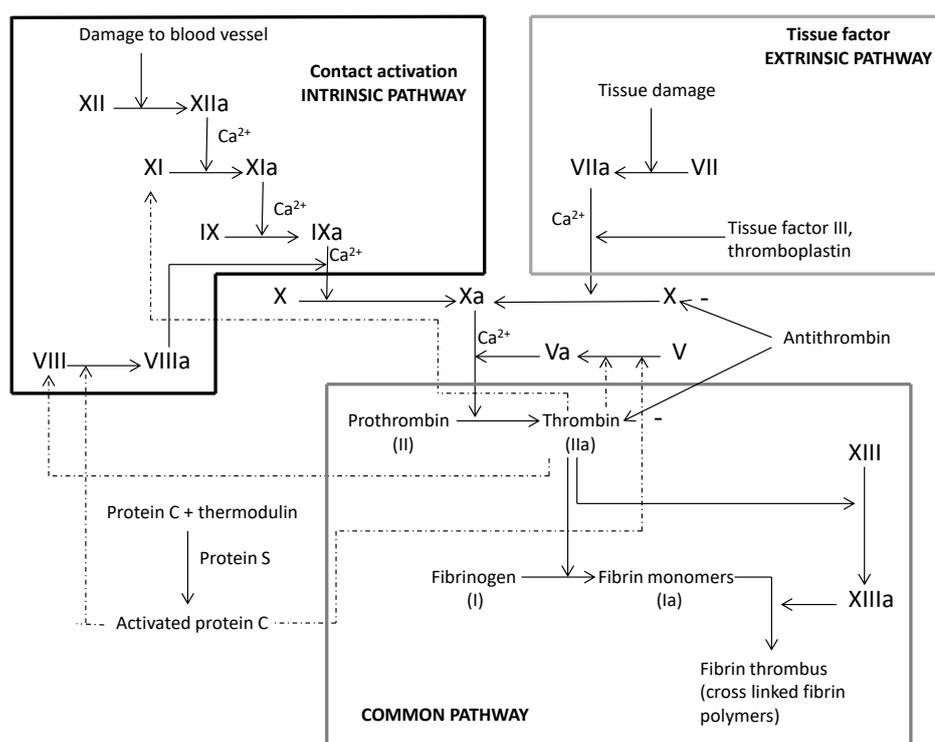


Figure 1. Summary of the different clotting cascade pathways

Résultats, partie A.2.

The first scale was investigated by analyzing the effect of the extracts on the antithrombin-mediated inhibition of factor Xa or IIa (thrombin) (Figure 2), using the anti-Xa/IIa assays.

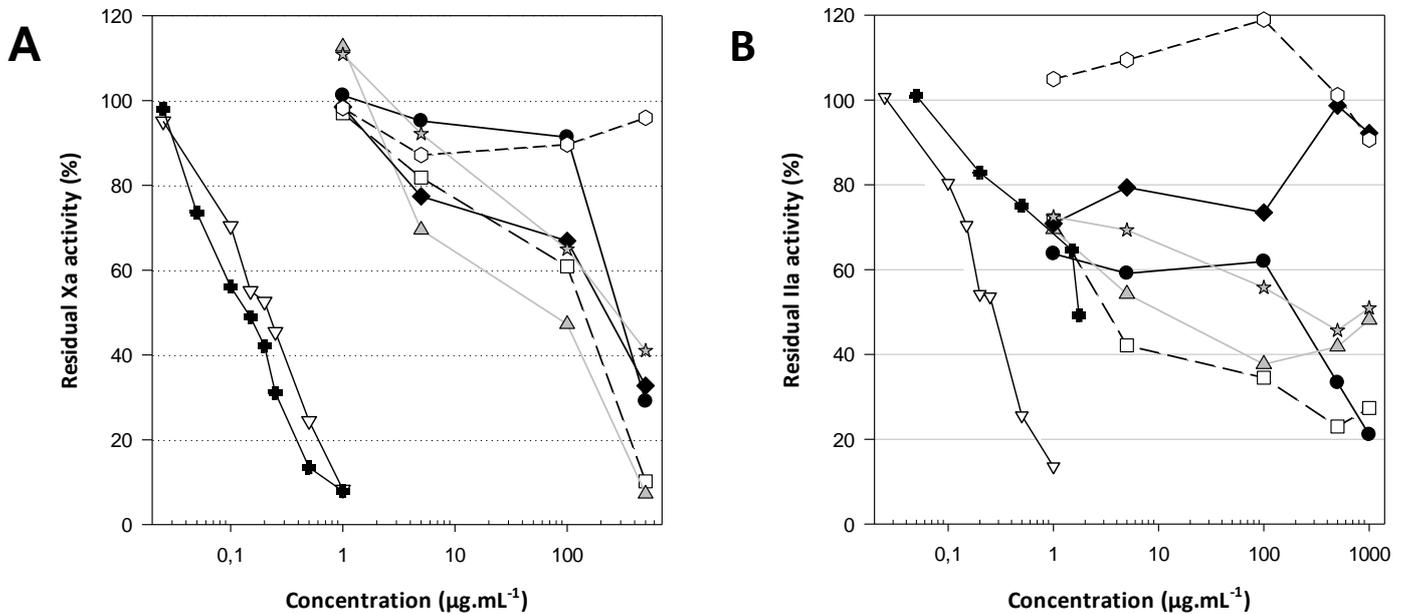


Figure 2. Dose-response curves of anti-Xa (A) and anti-IIa (B) antithrombin-mediated activities of the selected seaweed extracts (*Himanthalia elongata* ●, *Laminaria digitata* □, *Ascophyllum nodosum* △, *Fucus vesiculosus* ◆, *Ulva lactuca* ○, *Chondrus crispus* ☆), compared to Lovenox[®] (■) and heparin (▽).

The effect on the antithrombin-mediated inhibition of factor Xa was very different among algal species (Figure 2A). The extract from *Ulva lactuca* was devoid of any anticoagulant activity, as the residual Xa activity was almost 100% regardless of the extract concentration tested. *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata* extracts showed the highest anti-Xa activity, with a strong inhibition of factor Xa, close to 95% for an extract concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. However, this anti-Xa activity waned when decreasing the extract concentration. It was reduced by half with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of extract and completely disappeared with 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of extract.

On the other hand, a dose-dependent inhibition of factor IIa (thrombin) was observed for the different seaweed extracts (Figure 2B). The extracts from *Himanthalia elongata*, *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum* showed the best ability to inhibit factor IIa, with a reduction in activity by about 40% for *Himanthalia elongata* and *Ascophyllum nodosum* and by 60% for *Laminaria digitata*, with 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of extract. Conversely, the extracts from *Ulva lactuca* and *Fucus vesiculosus* did not show any antithrombin-mediated inhibition of factor IIa, regardless of the concentration tested. Remarkably, none of the extracts inhibited factor IIa in the absence of antithrombin (data not shown), suggesting that the inhibition observed was antithrombin-mediated.

Résultats, partie A.2.

Overall, the anticoagulant activity of the samples was lower than that of the commercial anticoagulants tested, heparin and Lovenox[®], in particular regarding the inhibition of factor Xa: in the concentration scale of the study, the concentration at which the algal extracts started to lose their anti-Xa activity ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) corresponded to a maximum effect of heparin and Lovenox[®]. Only the extract from *Laminaria digitata* seemed to present an interesting anti-IIa activity, close to that of Lovenox[®].

The anticoagulant activity of the seaweed extracts was then investigated at a broader scale, exploring the intrinsic, extrinsic and common pathways of the coagulation cascade (Figure 1). First, the APTT was used to evaluate the effect of the seaweed extracts on the contact activation (intrinsic) and/or common coagulation pathways. This assay is commonly used to measure the anticoagulant activity involving coagulation factors such as prekallikrein, high-molecular-weight kininogen, factors XII, XI, VIII and IX (intrinsic pathway), and, to a lesser extent, factors X, V, II and I (common pathway).

All the seaweed extracts prolonged the clotting time compared to the negative control (0.9% NaCl), at a concentration greater than or equal to $8.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 3).

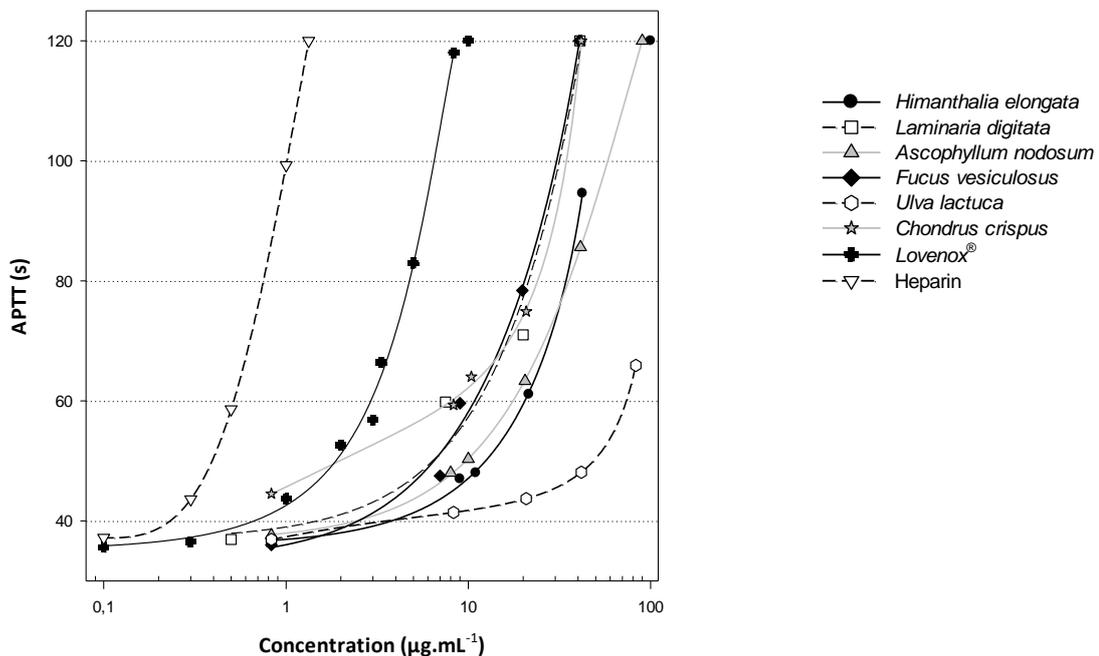


Figure 3. APTT analysis of the anticoagulant activity of the seaweed extracts. The clotting time of plasma in the absence of extracts (negative control, 0.9% NaCl) was 38.2 s. The maximum clotting time measured by the coagulometer for this assay was 120 s (no coagulation within this time range).

These results strongly suggest that the seaweed extracts inhibit the intrinsic and/or common pathway. The most potent activity was recorded with the extracts *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* and *Chondrus crispus*, whose clotting time was longer than 120 s at the

concentration of $83 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Comparatively, Lovenox[®] and heparin prolonged the coagulation time at lower concentrations: $8.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $0.83 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. In addition, the extract from *Ulva lactuca* was also able to delay the plasma clotting time, but to a lesser extent. Its anticoagulant capacity was indeed higher than that of the negative control but only reached a clotting time longer than 120 s at the concentration of $830 \mu\text{g.mL}^{-1}$, which was 10-fold higher than that of all the other extracts.

The PT was then used to evaluate the effect of the seaweed extracts on the tissue factor (extrinsic) coagulation pathway (Figure 4). This assay allows to assess the anticoagulant activity involving coagulation factor VII, mainly, and, to a very less extent, factors X, V, II and I. (Figure 1).

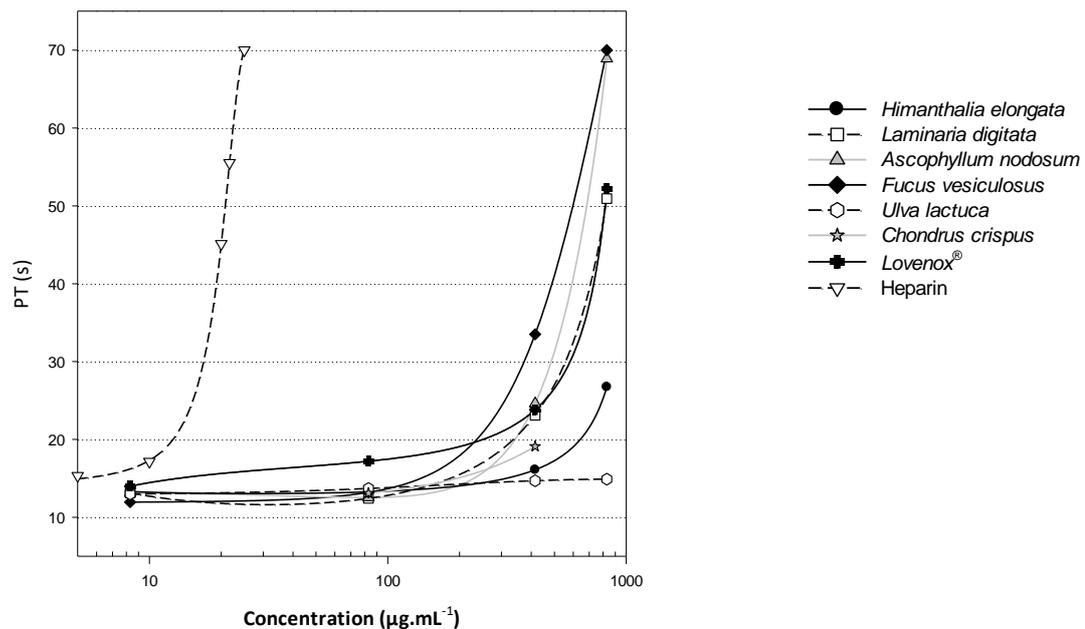


Figure 4. PT analysis of the anticoagulant activity of the seaweed extracts. The clotting time of plasma in the absence of extracts (negative control, 0.9% NaCl) was 13.1 s. The maximum clotting time measured by the coagulometer for this assay was 70 s (no coagulation within this time range).

All extracts, except that from *Ulva lactuca*, prolonged the time required for clot formation, suggesting that the extrinsic coagulation was inhibited. However, the anticoagulant activity of the different extracts was low. The most active extracts, i.e. those from *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*, reached a clotting time longer than 70 s at the concentration of $830 \mu\text{g.mL}^{-1}$, which was 1000-fold higher than that of heparin. Interestingly, Lovenox[®] also showed a low anticoagulant activity on the extrinsic pathway, even lower than that of the most active extracts.

Finally, the TT was used to evaluate the effect of seaweed extracts on the common pathway (table 2). This assay is commonly used to measure the anticoagulant activity involving the

Résultats, partie A.2.

conversion of fibrinogen into fibrin (Figure 1): all the coagulation factors of the common pathway are potentially involved, except factor XIII.

Table 2. TT analysis of the anticoagulant activity of the seaweed extracts. The clotting time of plasma in the absence of extracts (negative control, 0.9% NaCl) was 12.9 s. The maximum clotting time measured by the coagulometer for this assay was 60 s (no coagulation within this time range).

Extract concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.125	1.25	12.5	125
NaCl 0.9%	16.1			
<i>Himanthalia elongata</i>	17.3	17.1	20.0	56.2
<i>Laminaria digitata</i>	16.9	17.6	28.3	60
<i>Ascophyllum nodosum</i>	17.3	16.8	24.0	60
<i>Fucus vesiculosus</i>	17.1	17.4	24.5	60
<i>Ulva lactuca</i>	16.9	17.6	28.3	60
<i>Chondrus crispus</i>	17.3	17.5	22.8	60
Lovenox [®]	17.3	35.6	60.0	
Heparin	18.5	60.0	-	-

The TT assay revealed that except the extract from *Himanthalia elongata*, all the other seaweed extracts showed a similar activity and prolonged the clotting time to more than 60 s at the concentration of 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (table 2). At a concentration of 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the best results were obtained with the extracts from *Laminaria digitata* and *Ulva lactuca*, for which a clotting time of about 28 s was recorded, whereas no inhibition was observed at the concentration of 1.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In contrast, heparin was still capable of inhibiting coagulation at this concentration, with a clotting time longer than 60 s. Furthermore, at 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the coagulation time of all extracts was shorter than that of Lovenox[®] at 1.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. These results thus demonstrate that all the seaweed extracts tested are of poor interest in terms of anticoagulant activity targeting the common pathway of the coagulation cascade.

Table 3. Overall anticoagulant activity of the seaweed extracts.

	Extract concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)						
	Residual activity ^(a)	Xa	Residual activity ^(b)	IIa	APTT ^(b)	PT ^(b)	TT ^(b)
<i>Himanthalia elongata</i>	468		258		32.1	814	< 125
<i>Laminaria digitata</i>	169		2.6		19.6	492	< 125
<i>Ascophyllum nodosum</i>	79		7.5		32	440	< 125
<i>Fucus vesiculosus</i>	313		> 1000		18.5	327	< 125
<i>Ulva lactuca</i>	> 500		> 1000		> 83	> 830	< 125
<i>Chondrus crispus</i>	253		194		21	> 415	< 125
Heparin	0.20		0.25		0.7	16	< 1.25
Lovenox [®]	0.15		1.8		4.5	495	< 1.25

^(a) Extract concentration inhibiting 50% of the coagulation factor residual activity (IC_{50})

^(b) Extract concentration enabling to double the coagulation time of the negative control (NaCl 0.9%)

Discussion

The aim of this study was to evaluate the anticoagulant potential of common macroalgae that can be found on the French Atlantic coast. Six different macroalgae, belonging to the three main divisions (brown, red and green algae), were subjected to aqueous extraction, based on the high solubility of algal polysaccharides in aqueous solution. The seaweed extracts were evaluated for their potential to inhibit different pathways of the coagulation cascade: the specific antithrombin-dependent pathway (anti-Xa and anti-IIa), and the intrinsic and/or common (APTT), extrinsic (PT) and common (TT) anticoagulant pathways.

Overall, the anti-Xa activity of all extracts was relatively low compared to that of Lovenox[®] or heparin (Figure 2A). The extract with the highest anti-Xa activity was from *Ascophyllum nodosum*. It inhibited factor Xa activity with an IC₅₀ close to 79 µg.mL⁻¹, whereas both Lovenox[®] and heparin almost completely inhibited factor Xa at 1 µg.mL⁻¹ and exhibited much lower IC₅₀ of 0.15 and 0.20 µg.mL⁻¹, respectively (table 3).

Furthermore, the extract from *Ulva lactuca* showed no anticoagulant potential in none of the tested pathways. Little work has been done on green macroalgae containing sulfated rhamnose moieties such as ulvans (Wang et al. 2014), yet previous studies on *Monostroma* (Maeda et al. 1991; Mao et al. 2009; Li et al. 2011), *Arthrospira platensis* (Majdoub et al. 2009) and *Ulva conglobata* (Mao et al. 2006) species have reported important effects of sulfated rhamnans on the anticoagulant activity. For instance, Mao and colleagues have shown that sulfated ulvans from *Ulva conglobata* prolonged the APTT within a concentration range only 5-fold higher than that of heparin (Mao et al. 2006). This study also revealed that the mechanism of this anticoagulant activity was mediated by the sulfated ulvans through direct inhibition of thrombin. The extract from *Ulva lactuca* tested in our study was not in line with these observations. This lack of activity could be explained by the high sulfate content of the *Ulva conglobata* extract (23-35%) produced in the work from Mao *et al.*, compared to the sulfate content of the *Ulva lactuca* extract (about 13%) obtained in our study. However, this might not be the only reason, given that most crude seaweed extracts had significant anticoagulant properties associated with prolonged APTT, except the extract from *Ulva lactuca* (Figure 3).

The extracts from *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* and *Chondrus crispus* were among the most active and presented similar anticoagulant activities characterized by interesting extract concentrations of 19.6, 18.5 and 21 µg/mL⁻¹, enabling to double the APTT of the negative control (table 3). These concentrations were indeed within a concentration range only 5-fold higher than that of Lovenox[®] (4.5 µg/mL⁻¹), which is an anticoagulant agent used to prevent pulmonary embolism in patients undergoing surgery, or medical patients with severely restricted mobility during acute illness. These findings are consistent with those obtained on crude polysaccharides from *Fucus vesiculosus* and *Laminaria brasiliensis* by Pereira and colleagues (Pereira, Mulloy, et Mourão 1999) who reported that fucoïdanes extracted from these brown algae presented interesting anticoagulant effects on the APTT, in particular for the *Laminaria brasiliensis* extract.

Moreover, these results are really interesting regarding the fact that these seaweed extracts were shown to contain at least 15% (*Laminaria digitata* extract) to 46.5% of ash and proteins (*Fucus vesiculosus* extract) (table 1), while Lovenox[®] is a pure low molecular weight heparin. We envisage for this reason to further develop a more advanced method of extraction and purification allowing to obtain purer sulfated polysaccharide extracts from these three particular macroalgae, namely fucoïdians and carrageenans (Jiao et al. 2011), which might improve their APTT anticoagulant activity.

Our findings on the inhibition of factor IIa (Figure 2B) showed that most of the tested extracts had the ability to stimulate the antithrombin-mediated inhibition of thrombin. The extract from *Laminaria digitata* was the most active, inhibiting factor IIa with an IC₅₀ of 2.6 µg.mL⁻¹, compared to the extracts from *Ascophyllum nodosum* and *Himanthalia elongata*, whose IC₅₀ were 7.5 and 258 µg.mL⁻¹, respectively (table 3). These results are consistent with the fact that these extracts, in particular that from *Laminaria digitata*, showed an interesting anticoagulant activity on the APTT. Only the extract from *Fucus vesiculosus* showed surprising results, combining both an interesting APTT anticoagulant activity and a lack of both anti Xa and anti-IIa activities, suggesting that this extract had an effect on the extrinsic pathway rather than on the common pathway.

Finally, regarding the effects of the seaweed extracts on the PT, which is the measure of the extrinsic pathway clotting time, we observed that the extracts from *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* were able to prolong the time of clot formation with extract concentrations of 492, 440 and 327 µg/mL⁻¹, enabling to double the PT of the negative control (table 3), indicating that the extrinsic pathway of coagulation was inhibited, to a very lesser extent than with heparin (0.7 µg/mL⁻¹) but similarly to Lovenox[®] (495 µg/mL⁻¹). *Fucus vesiculosus* extract was even more active than Lovenox[®], which is in agreement with the work of Jin *et al.* (Jin et al. 2013) that reported that fucoïdan extracts from *Laminaria Japonica* exhibited a PT anticoagulant activity, even if this activity was very low compared to their APTT anticoagulant activity. Moreover, the other seaweed extracts did not show any propensity to prolong the PT, which is in accordance with other studies that concluded that sulfated polysaccharides from brown or red macroalgae seem to act mainly on the antithrombin-mediated coagulation pathway and, therefore, have a greater effect on the intrinsic and/or common (APTT) rather than the extrinsic (PT) pathway (Melo et al. 2004; Wang et al. 2010; Gómez-Ordóñez, Jiménez-Escrig, et Rupérez 2014).

Conclusion

This study showed that some of the French edible macroalgae extracts produced exhibited interesting anticoagulant activities. These activities were really not satisfying in terms of antithrombin-mediated inhibition of factor Xa when compared with heparin or Lovenox[®]. On the contrary, most of the extracts were shown to have a significant APTT anticoagulant activity, which means that they were mostly effective on the intrinsic and/or common pathways of the coagulation cascade, particularly the extracts from the brown algae

Résultats, partie A.2.

Laminaria digitata and *Fucus vesiculosus* and from the red alga *Chondrus crispus*. The extract from *Laminaria digitata* also presented an interesting anti-IIa activity. Taken together, these findings would make it a very attractive anticoagulant candidate for further development. Furthermore, our study was conducted on crude seaweed extracts that contained for the best active extracts from 15% (*Laminaria digitata* extract) to 46.5% of ash and proteins (*Fucus vesiculosus* extract). Hence, as previously reported, a better purification of these extracts in order to obtain purer sulfated polysaccharide extracts, namely fucoïdanes and carrageenanes, might increase the anticoagulant potency (M. S. Pereira, Mulloy, et Mourão 1999).

Acknowledgements:

We are very grateful to the hospital of La Rochelle, France that kindly provided us the Lovenox[®], and to the “Association nationale de la recherche et de la technologie”, for contributing to this work by providing a part of a PhD funding.

A.3. Production pilote de polysaccharides sulfatés purifiés, évaluation de leur activité anti-coagulante et impact de la sulfatation sur l'activité des ulvanes

A.3.1. Production de polysaccharides sulfatés purifiés et évaluation de leur activité anti-coagulante

A.3.1.1. Introduction :

Lors de la 1^{ère} partie, nous avons criblé les extraits aqueux de différentes macroalgues riches en polysaccharides sulfatés (entre 33 et 46%) et isolé 3 d'entre elles. Les trois macroalgues choisies représentent les trois grandes classes : *Laminaria digitata* pour les macroalgues brunes, *Chondrus crispus* pour les macroalgues rouges et *Ulva sp.* pour les macroalgues vertes. Tous ces extraits aqueux sont riches en polysaccharides sulfatés mais contiennent également d'autres composés, comme des protéines (entre 3 et 14%).

Si, aujourd'hui, de nouvelles techniques sont développées afin d'améliorer et de faciliter l'extraction des molécules algales et, en particulier des polysaccharides comme les extractions assistées par des enzymes, l'utilisation d'ultrasons, de microondes, des extractions par fluides supercritiques ou sous très hautes pressions, la grande majorité des extractions et purification font intervenir des solvants.

L'objectif de cette deuxième partie est d'isoler et de purifier les polysaccharides sulfatés des trois macroalgues choisies et d'étudier le potentiel anti-coagulant de leurs polysaccharides sulfatés. Nous avons soumis ces 3 macroalgues au procédé développé par l'entreprise SEPROSYS (procédé SEPROSYS[®]) afin d'extraire et purifier leurs polysaccharides sulfatés à l'échelle pilote et d'évaluer leur activité anti-coagulante. Ce procédé, qui ne fait intervenir aucun solvant et peut-être intégré dans une démarche de « chimie verte » permet d'obtenir les polysaccharides sulfatés avec une pureté très intéressante, autour de 87%. Comme dans la 1^{ère} partie, leurs activités anti-coagulantes ont été comparées à l'activité anti-coagulante de polysaccharides sulfatés purs : les anti-coagulants commerciaux Héparine NF et Lovenox[®], mais également des polysaccharides sulfatés algaux commerciaux (fucoïdanes extraits de *Fucus vesiculosus* et des ulvanes extraits d'*Ulva lactuca*).

A.3.1.2. Matériel et méthodes :

Matériel :

Les algues *Laminaria digitata* et *Chondrus crispus* ont été achetées chez Aléor sous forme de poudres d'algues dessalées. *Ulva sp.* a été fournie par un partenaire de l'entreprise SEPROSYS, la ferme du Douhet située sur l'île d'Oléron sous forme de feuilles séchées non dessalées.

Résultats, partie A.3.

Les fucoïdanes ont été achetés chez Sigma-Aldrich (France) et les ulvanes chez Elicityl (Grenoble, France).

HPLC par gel perméation :

L'analyse structurale des polysaccharides extraits a été réalisée sur un système HPLC Agilent technologies 1100 LC/RID avec deux colonnes de gel perméation de 30 cm en séries: TSK gel 5000 PW and TSK gel 4000 PW. La température d'analyse est de 37°C et le tampon d'éluion de l'acétate d'ammonium 0,1M. 20 µL d'échantillon à 1 mg.mL⁻¹ ont été injectés à un débit de 0,5 mL/min. Les produits ont été détectés et quantifiés par réfractométrie différentielle et le logiciel HP Chemstation en mode off-line a été utilisé pour le traitement des données. Des standards de dextran de 1000 à 10000 Da ont été utilisés comme standards. La masse molaire a été calculée en utilisant la formule suivante (Ye et al, 2009) :

$$M_w = (\sum N_i \times M_i^2) / (\sum N_i \times M_i)$$

Où N_i est le nombre de moles de l'espèce du polymère et M_i la masse moléculaire du polymère.

Composition biochimique :

Les dosages biochimiques sont similaires à ceux décrits dans la partie A.2.

Procédé d'extraction :

500 g d'algues sèches de type *Ulva sp.* sont trempés dans 15 L d'eau brute pendant 10 min à température ambiante. Les algues sont ensuite essorées et pressées à l'aide d'un cône en tissu afin de retirer le plus d'eau possible. Les algues lavées sont ensuite broyées dans 5 L d'eau déminéralisée à 80°C à l'aide d'un broyeur à couteau jusqu'à l'obtention de particules de moins de 2 mm de diamètre. Les 5 L de broyat sont transférés dans une cuve thermostatée à 80°C contenant 2,5 L d'eau déminéralisée chaude. L'extraction est réalisée sous agitation constante à l'aide d'un agitateur à pales à une vitesse de rotation de 10 tours/min pendant 2 h. Les pulpes sont ensuite soutirées de la cuve, filtrées et pressées à l'aide d'un cône en tissu afin d'extraire le plus de jus possible. Environ 13 litres de jus d'extraction sont récupérés puis filtrés via une unité d'ultrafiltration équipée d'une membrane de type Kerasep KBW 15 kDa de Novasep Process. La filtration est réalisée à 80°C, 5 bars et à un débit de circulation de 450 L/h, soit une vitesse de circulation de 5 m/s. La filtration est poursuivie jusqu'à obtenir un rétentat d'environ 4°B, qui est alors soutiré de l'unité. Un volume de 1,5 L de ce rétentat est ensuite déminéralisé par passage sur une colonne contenant 100 mL de résine anionique forte de type Amberlite FPA 98 sous forme OH⁻, montée en série avec une colonne contenant 200 mL de résine cationique forte de type Amberlite IR 120 Na sous forme H⁺. La circulation s'effectue à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 2 BV/h. Le produit désionisé est ensuite laissé à décanter dans une éprouvette plongée dans un bain marie à 180°C pendant 1,5 h. Le surnageant purifié riche en polysaccharides sulfatés est alors séparé du culot protéique précipité par centrifugation à 5000 g pendant 15 min. L'extrait est enfin neutralisé par ajout de NaOH jusqu'à l'obtention d'un pH de 7 puis lyophilisé.

Résultats, partie A.3.

Pour l'extraction des polysaccharides sulfatés de *Laminaria digitata*, le même protocole est utilisé, en ajoutant simplement une étape de précipitation des alginates à la fin de l'extraction aqueuse par ajout de HCl 0,03M. Cet ajout est réalisé sous agitation constante, à température ambiante, jusqu'à précipitation des alginates. L'extrait est ensuite neutralisé par ajout de soude 0,1 M avant l'ultrafiltration.

Tests préliminaires de dépolymérisation sur résines d'échange d'ions:

La dépolymérisation par résines d'échange d'ions a été réalisée sur la résine AMBERLITE™ FPC23 H. Il s'agit d'une résine acide fort sous forme H⁺.

100 mL de polysaccharides sont préparés à 25 mg.mL⁻¹. Le circuit comprend la solution de polysaccharides, une pompe péristaltique et une colonne contenant 10 mL de résine. La solution de polysaccharides et la colonne sont disposées dans un bain-marie à 80°C. Le débit est fixé à 12 mL.min⁻¹. Des prélèvements de 1mL sont réalisés toutes les heures pendant 8 heures puis à 24h et 30h. Le suivi de la masse moléculaire est ensuite réalisé par HPLC.

Production des polysaccharides dépolymérisés de $M_{w,moyenne}$ données :

Après avoir déterminé le temps de dépolymérisation sur résine nécessaire à l'obtention de polysaccharides de masses moléculaires moyennes connues, la production de polysaccharides est réalisée de la même manière que pour le test préliminaire. La réaction est stoppée au temps déterminé à l'avance et la solution est neutralisée à pH 7 par ajout de NaOH 0.1M. Après dialyse (seuil de coupure 1kDa), la solution est conservée à -20°C pour analyses futures.

Evaluation de l'activité anti-coagulante des extraits par coagulométrie :

Les tests de coagulométrie sont similaires à ceux décrits dans la partie A.2.

A.3.1.3. Résultats et discussion :

i) Procédé pilote d'extraction

Le procédé développé par SEPROSYS comporte une partie de déminéralisation par échange d'ions. Lors de cette étape, la solution contenant les polysaccharides se doit d'être assez fluide pour pouvoir passer sur les résines d'échange d'ions. L'extrait de *Chondrus crispus* obtenu après l'ultrafiltration est beaucoup trop visqueux pour pouvoir être passé sur le process. Nous avons donc été dans l'obligation d'éliminer cette algue pour la suite de l'étude. Les polysaccharides obtenus à partir d'*Ulva sp.* et de *Laminaria digitata* à la fin du procédé, qui se trouvent sous forme de sels de sodium, seront appelés ULVAN-01 et LAMI-01 dans la suite de l'étude.

L'algue non dessalée comporte 50% de sels. Le procédé SEPROSYS® permet d'obtenir entre 4 et 5% d'ulvanes purifiés en masse sèche de l'algue de départ non dessalée, soit entre 8 et 10% de l'algue sèche dessalée. Ce rendement, bien qu'assez faible, est compris dans la fourchette de données que l'on peut trouver dans la littérature. En effet, les rendements en ulvanes classiquement observés sont situés entre 1,2 et 27,5% par rapport au poids sec de l'algue (Sinquin et Collic-Jouault 2014).

ii) Caractérisation biochimique des extraits SEPROSYS®

Le procédé SEPROSYS® est efficace en termes de purification du polysaccharide sulfaté. En effet, ULVAN-01 possède (tableau VII) seulement 4% de protéines contaminantes. ULVAN-01 est composé de 40% de sucres neutres et 34% d'acides uroniques, ce qui se trouve dans la fourchette haute de ce qui peut se trouver généralement dans les ulvanes en termes de sucres acides. Sa masse moléculaire moyenne est d'environ 56 kDa, avec un indice de polydispersité assez faible (1,8) ce qui est bien inférieur à la masse moléculaire annoncée pour l'ulvane commercial de plus de 300 kDa. De même, LAMI-01 présente une pureté élevée. Il est composé en grande majorité de sucres neutres (73%), de 17% d'acides uroniques et de 4,5% de sulfates. Son poids moléculaire moyen se trouve autour de 45 kDa. Cependant, nous avons mis en évidence une très forte polydispersité (autour de 6) de cet extrait polysaccharidique, qui est constitué d'un très grand nombre de polysaccharides d'un poids moléculaire plus faible, entre 7 et 12 kDa.

Tableau VII Caractérisation biochimique des extraits SEPROSYS®

	Neutral sugars	Uronic acids	Sulfates	Proteins	Polyphenols	Lipids	Ashes	Mw
	% (w/w _{dry extract})							(Da)
ULVAN-01	41,0	34,0	11	4,0	0	0	23,0	56 700
LAMI-01	73,0	17,0	4,5	4,3	0	0	nd	45 200

Le taux de cendres de ULVAN-01, qui est sous forme de sel de sodium, est assez élevé, 23%. De ces 23%, 14% peuvent être expliqués par la présence des groupements Na₂SO₄ sur les polysaccharides. En effet, lors de l'étape de détermination du taux de cendres, l'extrait est chauffé à 550°C, ce qui permet de détruire le squelette carboné des polysaccharides mais pas les groupements Na₂SO₄. Cependant environ 9% du taux de cendre ne peuvent pas être expliqués par ces groupements. Nous avons alors fait l'hypothèse de la présence de sels chélatés par interactions électrostatiques dans nos extraits qui n'auraient pas été éliminés lors de l'étape d'ultrafiltration.

Nous pouvons déduire de cette composition biochimique qu'ULVAN-01 est d'une pureté très intéressante, supérieure à 87%.

iii) Activité anti-coagulante des extraits SEPROSYS® :

L'activité anti-coagulante des polysaccharides extraits par le procédé SEPROSYS® a été mesurée par coagulométrie. Afin de comparer les résultats obtenus avec ceux des extraits aqueux, tous les résultats sont présentés sur le même graphique (Figure 26). L'activité de polysaccharides commerciaux ; des ulvanes et des fucoïdanes a également été mesurée ainsi que celles d'une héparine non fractionnée et du Lovenox® à titre de comparaison.

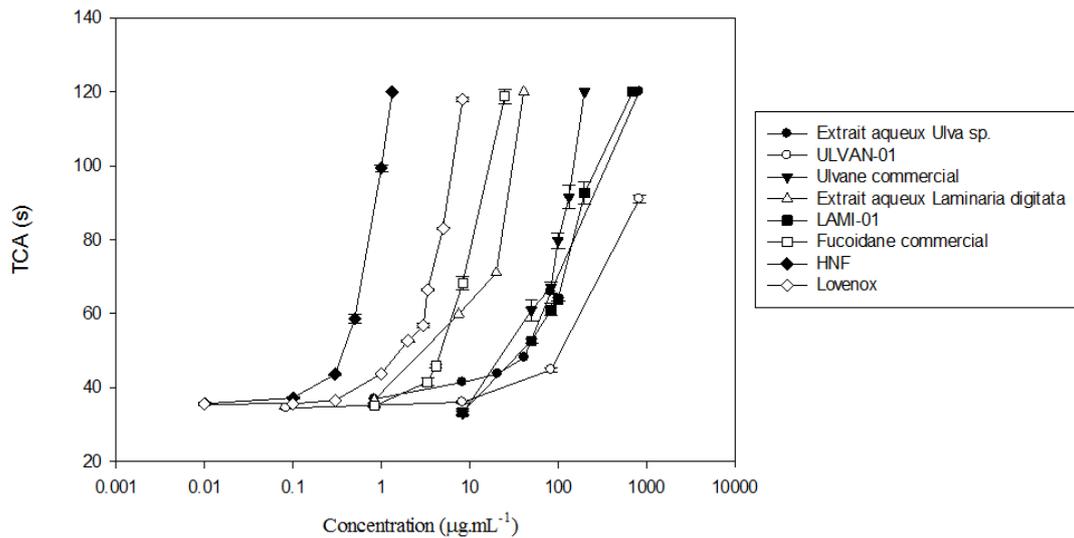


Figure 26 : Analyse TCA des extraits aqueux et SEPROSYS de *Laminaria digitata* et *Ulva sp.* Le temps de coagulation du plasma en l'absence d'extrait (témoin négatif, NaCl 0,9%) est de 33,2 s. Le temps de coagulation maximal mesuré est de 120 s.

Le test TCA, qui mesure l'activité anti-coagulante sur la voie intrinsèque et/ou commune de la coagulation montre que les extraits de SEPROSYS, qu'ils s'agissent des ulvanes d'*Ulva sp.* ou des fucoïdanes de *Laminaria digitata*, ont une activité anti-coagulante plus faible que leurs extraits aqueux ou commerciaux associés (Figure 26). En effet, la concentration nécessaire d'extrait pour doubler le temps de coagulation du témoin négatif est de $246 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour ULVAN-01 contre $82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour l'extrait aqueux d'*Ulva sp.* et $72 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour l'ulvane commercial (tableau VIII). Ainsi, le polysaccharide sulfaté produit par le procédé SEPROSYS® n'est pas actif sur le test TCA. Cette observation est similaire pour les extraits de *Laminaria digitata*. En effet, l'extrait aqueux et les fucoïdanes commerciaux présentent des activités proches, les concentrations nécessaires au doublement du temps de coagulation du témoin négatif étant respectivement de $13,5$ et $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour LAMI-01, l'activité anti-coagulante diminue fortement et cette concentration passe à $101 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

L'analyse de l'activité anti-coagulante des extraits sur la voie commune de la coagulation (test TT) montre également que l'activité de l'extrait de *Laminaria digitata* de SEPROSYS est plus faible que celle de l'extrait aqueux ; la meilleure est celle du fucoïdane commercial. Pour les extraits d'*Ulva*, l'extrait aqueux est le plus actif, suivi de l'ulvane commercial tandis que l'activité d'ULVAN-01 est très faible (Figure 27). En effet, les concentrations nécessaires au doublement du temps de coagulation du témoin négatif sont respectivement de 20 , 87 et $117 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour l'extrait aqueux d'*Ulva sp.*, l'ulvane commercial et ULVAN-01 respectivement (tableau VIII). Pour les extraits de macroalgues brunes, la concentration nécessaire est de $14,4$, $22,6$ et $93 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le fucoïdane commercial, l'extrait aqueux de *Laminaria digitata* et LAMI-01 respectivement.

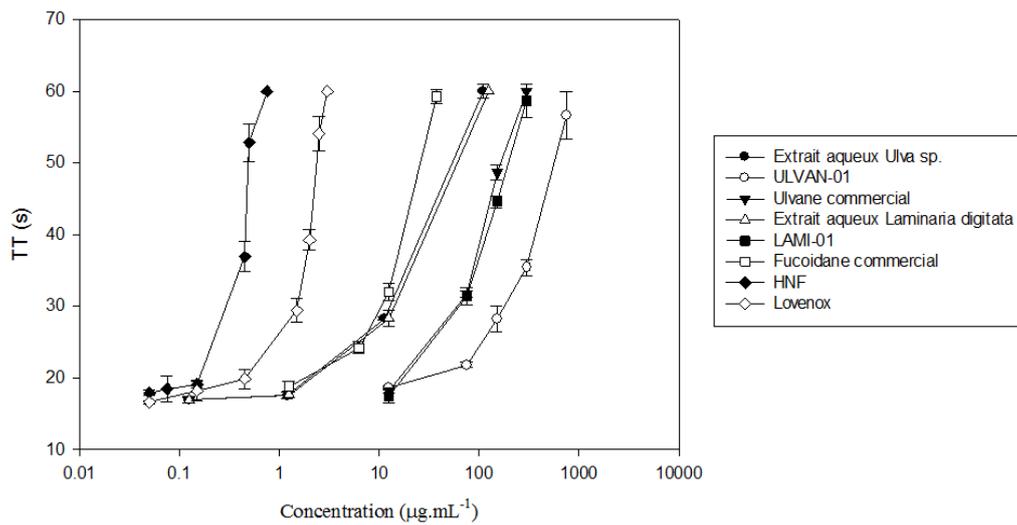


Figure 27 : Analyse TT des extraits aqueux et SEPROSYS® ULVAN-01 et LAMI-01. Le temps de coagulation du plasma en l'absence d'extrait (contrôle négatif, NaCl 0,9%) est de 18,3 s. Le temps de coagulation maximal mesuré est de 60 s.

Les extraits d'ulves (commerciaux, extraits aqueux ou SEPROSYS) n'ont aucune activité sur la voie extrinsèque de la coagulation (test PT) (données non présentées), et ce même pour des concentrations en extraits de 3 mg.mL⁻¹. Pour ce qui est des extraits de *Laminaria digitata*, l'activité assez faible observée pour l'extrait aqueux (cf partie A.2.) disparaît pour l'extrait purifié de fucoïdanes de *Laminaria* par le procédé de SEPROSYS.

Tableau VIII : Activité anti-coagulante d'ULVAN-01 et LAMI-01 : comparaison avec les extraits aqueux et commerciaux.

	Concentration de l'extrait (µg.mL ⁻¹)*		
	APTT	PT	TT
ULVAN-01	500	NA	40
<i>Ulva sp.</i> extrait aqueux	82	NA	20.2
Ulvane commercial	72	NA	87
LAMI-01	101	NA	93
<i>Laminaria digitata</i> extrait aqueux	19.6	492	22.6
Fucoïdane commercial	7.8	NA	14.4
Heparin	0.7	16	0.45
Lovenox®	4.5	495	1.82

NA = non actif

* Concentration nécessaire au doublement du temps de coagulation du témoin négatif (NaCl 0,9%)

L'hypothèse que nous avons privilégiée afin d'expliquer cette diminution importante de l'activité anti-coagulante des polysaccharides extraits par la méthode SEPROSYS et celle des extraits aqueux ainsi que commerciaux concerne leur masse moléculaire. En effet, l'ulvane commercial présente une masse moléculaire supérieure à 300 kDa tandis que celle

d'ULVAN-01 est de 56 kDa. Pour ce qui est des fucoïdanes, la masse moléculaire moyenne du fucoïdane commercial extrait de *Fucus vesiculosus* est de 62 kDa contre 45 kDa pour LAMI-01 mais avec un fort indice de polydispersité et beaucoup de polysaccharides de plus petite taille. La masse moléculaire des polysaccharides extraits et purifiés selon la méthode SEPROSYS[®] est donc bien plus faible que les ulvanes bruts que l'on peut retrouver dans les Ulves ou dans *Laminaria*.

Afin d'étudier l'impact de la masse moléculaire d'un ulvane sur son activité anti-coagulante, nous avons réalisé une dépolymérisation d'ULVAN-01 sur la résine d'échange d'ions FPC23 H. Au cours de la dépolymérisation, l'activité anti-coagulante d'ULVAN-01, déjà assez faible, décroît pour disparaître totalement pour des ulvanes de poids moléculaires moyens de 4 kDa (données non présentées). Comme il a été montré précédemment, ULVAN-01 ne présente aucune activité sur la voie intrinsèque de la coagulation (test PT), même pour des concentrations supérieures à 5 mg.mL⁻¹. Au cours de la dépolymérisation, les différents prélèvements ne présentent pas plus d'activité. Bien qu'assez faible, ULVAN-01 présente une activité anti-coagulante sur la voie intrinsèque et/ou commune de la coagulation (test aPTT). Sur cette voie de la coagulation, le temps de coagulation du plasma en présence 6,25 mg.mL⁻¹ d'ULVAN-01 est de 73 s (témoin négatif à 38,2 s). Plus celui-ci est dépolymérisé, plus le temps de coagulation diminue : l'ulvane perd donc son activité. En effet, pour un poids moléculaire moyen de 15 kDa, le temps de coagulation à la même concentration est de 68,2 s, 55,3 s pour un poids moléculaire moyen autour de 9 kDa puis 38 s pour l'ulvane avec un poids moléculaire moyen de 4 kDa. Ce résultat est similaire pour l'activité anti-coagulante des ulvanes dépolymérisés sur la voie commune de la coagulation (test TT). En effet, plus le poids moléculaire moyen diminue, plus le temps de coagulation du plasma diminue, ce qui indique une perte d'activité anti-coagulante.

Cette étude est la première concernant l'effet de la dépolymérisation sur l'activité anti-coagulante d'ulvanes de macroalgues du genre *Ulva*. Cependant, les résultats obtenus sont en accord avec plusieurs études précédentes sur l'influence de la masse moléculaire de fucanes extraits d'*Ecklonia kurome* (Nishino, Aizu, et Nagumo 1991b) ou d'arabinanes et galactanes sulfatés extraits de *Codium*. En effet, l'étude de Nishino et al. a montré que l'activité anti-coagulante de fucanes extraits d'*Ecklonia*, à sulfatation équivalente, décroît avec la diminution de leur masse moléculaire. Les fucanes de masse moléculaire autour de 55 kDa sont plus actifs que ceux de 27 kDa et eux même le sont plus que ceux de 10 kDa. De même, les polysaccharides sulfatés de hauts poids moléculaires extraits de *Codium* ont montré une activité anti-coagulante sur les tests TCA et TT plus importante que ceux de plus faibles poids moléculaires (Ciancia et al. 2007) (pas d'activité pour le test PT quelle que soit la masse moléculaire).

Ainsi, l'hypothèse la plus probable pour expliquer cette faible activité anti-coagulante de ULVAN-01 et LAMI-01, comparée à celle des extraits aqueux ou des polysaccharides commerciaux, est celle d'un effet de la dépolymérisation des polysaccharides sulfatés lors du passage sur le procédé de SEPROSYS et, plus particulièrement, au moment des étapes d'échange d'ions qui acidifient la solution et pourraient donc être responsables de la dépolymérisation des polysaccharides.

Résultats, partie A.3.

Ces derniers résultats nous conduisent à nous interroger quant à l'activité anti-coagulante des ulvanes : en effet, aucun des extraits testés dans notre étude ne présente d'activité intéressante, et ce sur les trois voies de la coagulation *in vitro*. Cependant, la grande différence entre les ulvanes extraits de nos macroalgues et ceux présentant une activité anti-coagulante chez *Monostroma* et *Ulva conglobata* est la sulfatation. En effet, nos trois extraits présentent des taux de sulfates entre 10,5 et 13%, ce qui se trouve dans la moyenne basse de ce qui peut être trouvé dans les ulvanes. Au contraire, les ulvanes de *Monotroma* et *Ulva conglobata* possèdent des sulfatations bien plus élevées, avec jusqu'à 35% pour un extrait d'*Ulva conglobata* (Mao et al. 2006). Nombre d'études, en particulier sur les fucoïdanes, mais aussi sur les carraghénanes, insistent sur le rôle majeur de la sulfatation pour les polysaccharides sulfatés extraits de macroalgues brunes et rouges. Dans ce contexte, l'étude de l'impact de la sulfatation sur l'activité anti-coagulante d'ULVAN-01 fera l'objet de la partie 2 de ce chapitre.

A.3.2. Effet de la sulfatation sur l'activité anti-coagulante d'ulvanes extraits d'*Ulva sp.*

Résumé

Dans ce travail, nous présentons un procédé pilote d'extraction et de purification d'ulvanes extraits de la macroalgue verte *Ulva sp.* sous forme de feuilles séchées non dessalées, le procédé SEPROSYS[®]. Ce procédé d'extraction permet d'obtenir un extrait d'ulvanes (appelé ULVAN-01), d'une pureté élevée et cela sans utiliser ni solvant, ni acide. Le rendement d'extraction de polysaccharides sulfatés est de 5% de la macroalgue sèche non dessalée (avec environ 50% de sel). De plus, ce procédé est assez aisément transposable de l'échelle pilote à une échelle pré-industrielle, voire industrielle.

Afin de valoriser une matière première disponible et le procédé développé par l'entreprise, nous avons évalué l'activité anti-coagulante de ces ulvanes. Dans la partie A.1., nous avons conclu que l'*Ulva sp.* ne semblait pas être l'algue ayant le potentiel anti-coagulant le plus intéressant. Cependant, même si peu de travaux démontrent l'intérêt des ulvanes de macroalgues de genre *Ulva* pour l'activité anti-coagulante, le travail de Mao et al. sur des ulvanes à taux de sulfates élevé (W. Mao et al. 2006) montre le potentiel de cette biomasse largement sous-exploitée.

L'évaluation de la composition biochimique de ULVAN-01 montrant la faible sulfatation de l'extrait (10%), nous avons décidé d'augmenter la sulfatation de ULVAN-01 par une technique chimique afin d'étudier son impact sur l'activité anti-coagulante de nos ulvanes. L'extrait obtenu après sulfatation est appelé ULVAN-02 (taux de sulfates de 20%). Le procédé de sulfatation utilisé est un procédé assez classique, déjà utilisé sur certains polysaccharides faisant réagir le polysaccharide avec le complexe sulfur-trioxyde pyridine dans un solvant composé de pyridine et de diméthyl formamide (DMF).

Les résultats ont montré que l'augmentation de la sulfatation de ULVAN-01 augmente de façon très significative son activité anti-coagulante et cela sur toutes les étapes de la coagulation. De plus, nous avons montré que ULVAN-02 est particulièrement actif au début de la cascade de la coagulation *in vitro*, c'est-à-dire au niveau de voies intrinsèques et extrinsèques ou son activité se rapproche de celle de l'héparine et est plus élevée que celle du Lovenox[®]. Nous avons également mis en évidence que le taux de sulfate n'était pas le seul facteur responsable des modifications de l'activité anti-coagulante de ULVAN-01 mais que la position des sulfates influençait également l'activité et en particulier les cibles de l'ulvane.

L'ensemble des résultats est regroupé dans un article, à soumettre sous le titre « Effect of sulfatation on the anticoagulant activity of ulvans extracted from the green macroalgae *Ulva sp.* ». Ces résultats font également l'objet d'un dépôt de brevet français avec comme intitulé « Ulvanes sulfatés et utilisation dans la régulation des troubles de la coagulation », numéro de demande 16 50735.

Effect of sulfation on the anticoagulant activity of ulvans extracted from the green macroalgae *Ulva sp.*

Amandine Adrien^{1,2}, Nicolas Bridiau^{1*}, Delphine Dufour², Stanislas Baudouin², Thierry Maugard¹

¹ Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSS, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

² SEPROSYS, Séparations, Procédés, Systèmes, 12 Rue Marie-Aline Dusseau, 17000 Rochelle, France.

**Author for correspondance (Address: Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSS, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. Fax: +33 546458277; E-mail: nicolas.bridiau@univ-lr.fr)*

Abstract

Brown and red algal sulfated polysaccharides have been widely described as anticoagulant agents. However, data on green algae, especially on the genus *Ulva*, are limited. In this study, ulvans were isolated from the marine green algae of the genus *Ulva* using an acid- and solvent-free procedure. To investigate the effect of sulfation on polysaccharides, the extract underwent chemical sulfation. The potential anticoagulant activity of the sulfated extract was assessed using different methods, from the specific antithrombin-dependent pathway (anti-Xa and anti-IIa) to the intrinsic and/or common (Activated Partial Thromboplastin Time, APTT), extrinsic (Prothrombin Time, PT) or common (Thrombin Time, TT) anticoagulant pathways. Furthermore, the anticoagulant properties of the extracts were compared to those of commercial anticoagulants: heparin and Lovenox[®]. Regardless of the pathway or enzyme inhibition tested, the anticoagulant activity of the ulvan extract was, after doubling of the sulfation content (from 11% to 20%), much higher, even stronger than that of Lovenox[®] on the intrinsic and extrinsic coagulation pathways.

Keywords: Green macroalgae, Ulvans, Sulfation, Anti-coagulant activity

1. Introduction

Marine algae are used in several industrial applications and represented a marketing value of 5.5-6 billion per year in 2003 (McHugh 2003). They are mainly used for human consumption and in the hydrocolloid industry. The three main groups of marine algae (Phaeophyta, Rhodophyta and Chlorophyta) are rich sources of various compounds of interest such as proteins, pigments, polysaccharides whose potential market is estimated at several billion dollars (Pomponi 1999) and have been studied for their potential in pharmaceutical, cosmetic or nutraceutical applications. Polysaccharides from brown and red marine algae are widely used in the industry for their gelling properties, in particular alginates, agar and carrageenans (McHugh 2003). Conversely, although they have been consumed for centuries, green macroalgae are still rather unexploited. Nevertheless, the discovery of ulvans, the sulfated polysaccharides from green algae of the genera *Ulva* and *Enteromorpha* has increased the interest in these seaweeds. Indeed, it has been shown that they have numerous biological activities, including immunoinflammatory (Granert et al. 1994; Jiao et al. 2011; Mohamed, Hashim, et Rahman 2012), antioxidant (Pilar Rupérez, Ahrazem, et Leal 2002; Rocha de Souza et al. 2007), antitumor (Noda et al. 1990; Bourgougnon et al. 1994; Zorofchian Moghadamtousi et al. 2014), antiviral (Damonte, Matulewicz, et Cerezo 2004; Jiao et al. 2011; Pujol et al. 2012; Witvrouw et De Clercq 1997) and anticoagulant (Jin et al. 2013; Pereira, Mulloy, et Mourão 1999; Carlucci et al. 1997; Chevolot et al. 2001) properties. Ulvans are mainly composed of rhamnose and uronic acids (glucuronic or iduronic acid) (Percival et McDowell 1967; Lahaye et Robic 2007). The main repeated disaccharide units of ulvans are $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-l-Rhap3S}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ and $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-l-Idop}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-l-Rhap3S}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ (Jiao et al. 2011).

Heparin belongs to the glycosaminoglycan (GAG) family of polysaccharides which is mainly composed of L-iduronic-2-O-sulfate acid and D-glucosamine-N-sulfate, 6-O-sulfate. Unfractionated heparin (UFH) has an average molecular weight of 15 kDa (Sommers et al. 2011). Its anticoagulant activity is primarily due to the specific antithrombin-binding pentasaccharide sequence where the central glucosamine is not only 2- and 6-O-sulfated but also 3-O-sulfated (Mulloy, Hogwood, et Gray 2010). Despite its major anticoagulant activity, heparin may cause serious adverse events such as thrombocytopenia (heparin-induced thrombocytopenia or HIT) (Warkentin et al. 1995) or hemorrhage (Da Silva et Sobel 2002). Moreover, its low bioavailability (Emanuele et Fareed 1987) makes such a treatment really expensive. To reduce the risks of adverse events, heparin may be depolymerized to produce smaller molecules, known as low-molecular-weight heparins (LMWH, $MW_{avg} \geq \sim 6$ kDa) (Hao et al. 2011). Although LMWH significantly reduce the risks of disorders associated with an anticoagulant treatment compared to UFH, they still are the leading cause of mortality, ahead of cancer (Sattari et Lowenthal 2011). Given the risks and high costs of these treatments, there is a compelling need for further investigation of new sources of anticoagulants.

The first studies on the anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from macroalgae have shown that polysaccharides from brown algae could be alternative sources of new anticoagulant compounds. Sulfated fucoidans from brown algae and sulfated galactans from

red seaweeds (also called carrageenans) seem to have a high anticoagulant activity. Data on the anticoagulant activity of polysaccharides from the green macroalgae are limited compared to brown and red algae but a few studies have demonstrated their potential. Regarding the anticoagulant activity, the most studied specie is *Codium* (Hayakawa et al. 2000; Jurd et al. 1995; Siddhanta et al. 1999; Matsubara et al. 2001; Shanmugam, Mody, et Siddhanta 2001; Ciancia et al. 2007) which contains sulfated arabinans and arabinogalactans, and then *Monostroma* which contains sulfated rhamnans (Maeda et al. 1991; Mao et al. 2009; Mao et al. 2008; Zhang et al. 2008; Li et al. 2011, 2012). A study has also shown the potential anticoagulant properties of ulvans extracted from *Ulva conglobata* (Mao et al. 2006).

The relationship between polysaccharide chemical structure and anticoagulant activity is unclear but previous studies have shown that several factors, such as the molecular weight, osidic composition, and sulfate content and position, may significantly affect the anticoagulant activity (Barros Gomes Camara et al. 2011; Jin et al. 2013). Polysaccharide sulfation appears to have a major impact on its anticoagulant potential. A study (Ciancia et al. 2007) have concluded that sulfated galactans extracted from *Codium fragile* and *Codium vermilara* with a high molecular weight and high sulfate content had a higher anticoagulant activity than low molecular weight and low sulfate content polysaccharides. Furthermore, the sole published study that has concluded on a high activity of sulfated rhamnans from the genus *Ulva* was based on highly sulfated ulvans (35% of sulfates) (Mao et al. 2006).

In this study, we developed a solvent- and acid-free procedure to extract ulvans from *Ulva sp.*. To study the effect of sulfation, a chemical sulfation based on sulfur-trioxide pyridine was performed. The anticoagulant activity of ulvan extracts was then assessed by monitoring the specific antithrombin-dependent pathway (anti-Xa and anti-IIa), the intrinsic and/or common (Activated Partial Thromboplastin Time: APTT), extrinsic (Prothrombin Time: PT), and common (Thrombin Time: TT) anticoagulant pathways and compared to the activity of two widely used anticoagulants: an UFH and Lovenox[®] (LMWH).

2. Material and methods

2.1. Material

The green macroalgae *Ulva sp.* were cultivated in a pond in the “Ferme du Douhet”, a marine farm in Ile d’Oléron, France. They were collected in 2012 and dried.

Unfractionned heparin (UFH) was purchased from Interchim (Montluçon, France) (heparin sodium salt 12865E, batch 201274) and Lovenox[®] was kindly provided by the hospital of La Rochelle, France.

Unless otherwise indicated, all chemical reagents were purchased from Sigma Aldrich, France.

2.2. Methods

2.2.1. Extraction process

First, 500 g of *Ulva sp.* thallus were washed in 15 L of distilled water (1/30 (w/w)) for 10 minutes at room temperature (RT) and wrung with a fabric cone to remove water as possible. The washed algae were then ground in 5 L of distilled water at 80°C until obtaining 2-mm particles. The 5 L of minced algae in water were transferred into a thermostated tank at 80°C containing 2.5 L of distilled water. The extraction was processed under constant agitation with a bladed stirrer at a rotation speed of 10 spins/minute for 2 hours. The pulps were then removed from the tank and filtered with the fabric cone to collect the aqueous extract. Then, 13 L of extracts were recovered and filtered with an ultrafiltration unit equipped with a Kerasep KBW 15kDa membrane (Novasep Process, France). The filtration was carried out at 80°C at a pressure of 5 bars and a circulation flow of 450 L/h (circulation speed of 5 m/s). The filtration was processed until obtaining a retentate around 4°B. Next, 1.5 L of retentate were demineralized by passage on a column containing 100 mL of Amberlite FPA 98, a strong anionic resin, in the OH⁻ form, in series with a column containing 200 mL of Amberlite IR 120 Na, a strong cationic resin, in the H⁺ form. The circulation was processed with a peristaltic pump at a flow rate of 2 BV/h. The deionized product was finally decanted in a water bath at 80°C for 2 hours. After a centrifugation at 5,000 g for 15 minutes at RT, the extract, referred to as ULVAN-01 was neutralized to pH 7 with 1 M NaOH and lyophilized (Figure 1).

2.2.2. Sulfation procedure

ULVAN-01 sulfation was carried out using the sulfur-trioxide pyridine complex (SO₃-pyridine) method in dimethylformamide (DMF) and pyridine.

Briefly, 500 mg of ULVAN-01 were dissolved in a mix of 10 mL of DMF and 1.4 mL of pyridine. The mixture was heated to 60°C. Sulfation was processed by progressive addition of 3 g of SO₃-pyridine complex for 2 hours at 60°C under constant stirring. The mixture was left for 2 additional hours at 60°C under stirring. After cooling of the mixture at RT, the mix was centrifuged at 5,000 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was then removed and the pellet was dissolved in 5 mL of 2.5 M NaOH and 45 mL of absolute ethanol was added (final concentration 90% (v/v)). After 12h at 4°C under stirring, the precipitate was isolated by centrifugation (10,000 g, 10 minutes, 4°C) and dissolved in 60 mL of distilled water. The solution was finally dialyzed for 7 days against water (cut-off 1 kDa) and lyophilized. The resulting sulfated extract was called ULVAN-02.

2.2.3. Chemical composition

Neutral sugar content was determined according to the phenol-sulfuric method (Dubois et al. 1951) using glucose as a standard. The uronic acid content was measured as described by Bitter et al (Bitter et Muir 1962). The protein content was determined using the Bradford protein assay (Bradford 1976). The sulfate content was obtained using 3-amino-7-

(dimethylamino)phenothizin-5-ium chloride (Azure A), which binds the sulfated groups in a polysaccharide chain (Jaques et al. 1968; Gao et al. 2003). The quantitation method of polyphenols was adapted from the original one (Singleton et Rossi 1965), using gallic acid as a standard: briefly, 50 μL of Folin-Ciocalteu reagent and 200 μL of 20% sodium carbonate were successively added to 100 μL of sample and the mixture was incubated in the dark for 45 min at room temperature, prior to absorbance reading at 730 nm. The ash content was quantified after 15h at 550°C. All analyses were performed at least in triplicate.

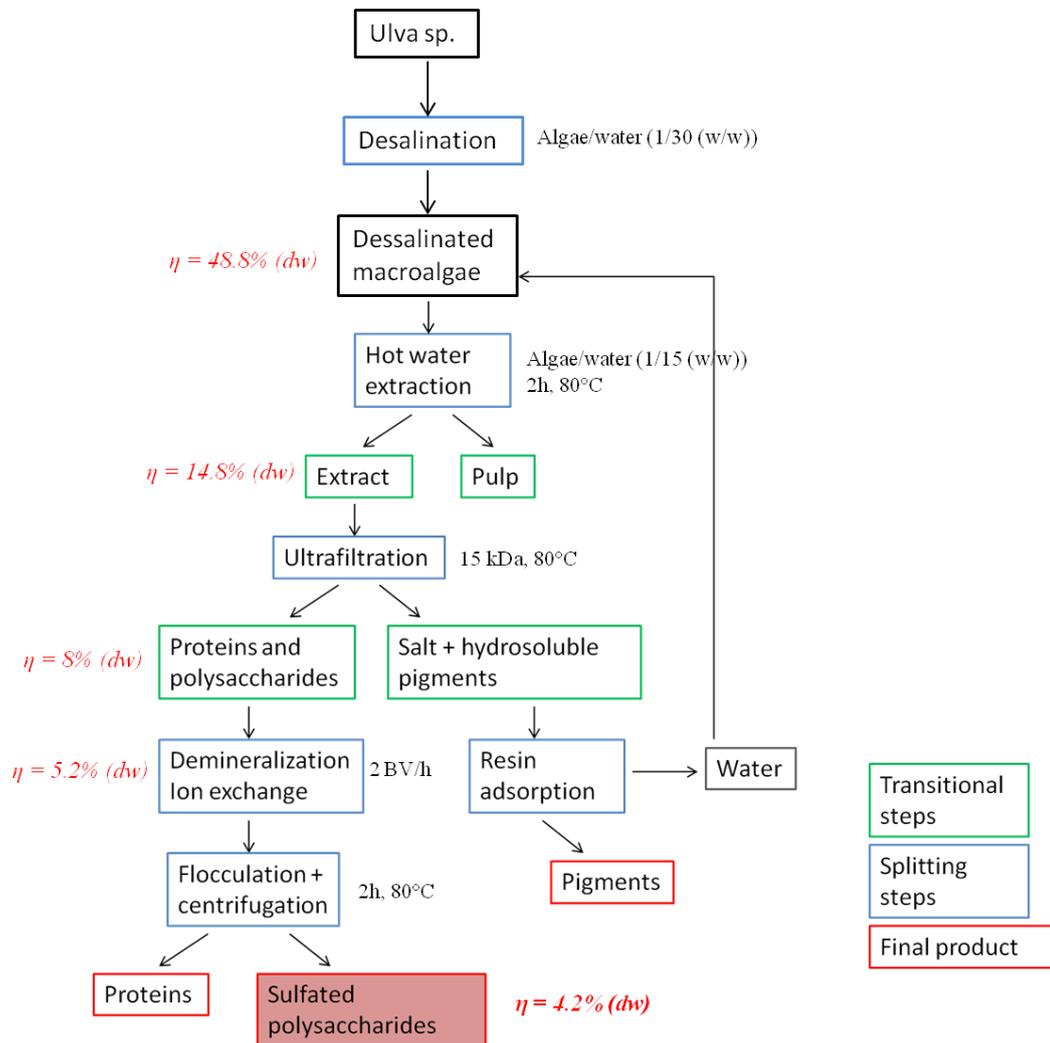


Figure 1: Different steps and yields (η) of the extraction procedure developed by SEPROSYS

2.2.4. Analysis of the extracts by high performance gel permeation chromatography

The structural and quantitative analyzes of the polysaccharide extracts were performed on a HPLC Agilent technologies 1100 LC/RID system with two successive exclusion chromatography columns of 30 cm in size: TSK gel 5000 PW and TSK gel 4000 PW. The analysis temperature was stabilized at 30°C and the elution buffer was 0.1M ammonium acetate. Then, 20 μL of 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ extract or sample were injected and the flow rate was 0.5

mL/min. The products were detected and quantified by differential refractometry using the HP Chemstation software in off-line mode for processing. The standard curve was made using dextran standards from 1,000 to 50,000 Da. The number-averaged molecular weight (M_n), weight-averaged molecular weight (M_w) and polydispersity index (I) were calculated as follows (Ye et al, 2009):

$$M_n = (\sum N_i \times M_i) / \sum N_i$$

$$M_w = (\sum N_i \times M_i^2) / (\sum N_i \times M_i)$$

$$I = M_w / M_n$$

where N_i is the number of moles of polymer species, M_i the molecular weight of polymer species

2.2.5. Nuclear magnetic resonance and ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS)

Carbon (^{13}C) NMR analyses were performed using a JEOL JNMLA400 spectrometer (400 MHz). All samples were studied in solution at a concentration of 50 mg/mL in D_2O .

The composition and the osidic sequence were determined by ultra high performance liquid chromatography coupled to a high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). Analysis were carried out using an UHPLC system “Acquity UPLC H-class” (Waters, Milford, USA) coupled to a high-resolution mass spectrometry “XEVO G2 S Q-TOF” equipped with an electrospray ionization source (Waters, Manchester, England). The UHPLC system was formed by a quaternary pump (Quaternary Solvent Manager, Waters) and an automatic injector (Sample Manager-FTN, Waters) equipped by a 10 μl injection loop. 5 μl of the samples were injected in a column “Acquity UPLC BEH Amide” (Waters) (2.1 x 500 mm, 1.7 μm), and the products were eluted at a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ using a gradient composed of solvents A (water/ammoniac 100/0.015 (v:v)) and B (acetonitrile/ammoniac 100/0.015 (v:v)), according to the following procedure: 0-3 min, 100% B; 3-3.1 min 100-70% B; 3.1-10 min, 70-50% B; 10-10.5 min, 50-45% B; 10.5-18 min, 100% B. During the analysis, the column and the injector were maintained at 30°C and 7°C, respectively.

The optimization of the MS parameters was carried out by direct infusion of the sample with a constant flow-rate of 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ prior to the UHPLC-MS/MS analysis. The final conditions applied in the ESI source were: source temperature 120°C, desolvation temperature 500°C, gas flow-rate of the cone 50 L/h, desolvation gas flow-rate 800 L/h, capillary voltage 2.5 kV, sampling cone 130 V and source compensation 80 V. The instrument was adjusted for the acquisition on a 50-2100 m/z interval, down regulated according to the fragmented ion with a scan time of 0.15 s. The analysis was operated in the negative ionization mode (ESI⁻) with the MS function in a centroid mode. Leucine Enkephalin (M=555.62 Da, 1 ng/ μl) was used as a lock-mass.

These analyses were carried out on an ulvan fraction of 9 kDa obtained after 19 h of resin depolymerization of ULVAN-01. Briefly, 100 mL of a solution of ULVAN-01 at 25 mg.mL⁻¹

were prepared and depolymerized on the resin AMBERLITE™ FPC23 H. The depolymerization circuit consisted of ULVAN-01 solution, a peristaltic pump and a column containing 10 mL of AMBERLITE™ FPC23 H. The polysaccharide solution and the column were maintained at 80°C throughout the experiment. The output was set at 12 mL.min⁻¹.

2.2.6. Clotting time assays

The anticoagulant activity of the different extracts was determined by measuring the APTT, PT or TT. All the assays were carried out using a Sart4 coagulometer and assay kits from Stago (France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 90 µL of normal human plasma (Stago, France) were mixed with 10 µL of 0.9% NaCl solution containing various sample amounts for each assay. For the APTT assay, 100 µL of APTT assay reagent were then added to the mixture prior to incubation for 3 min at 37°C and addition of 100 µL of 0.025M CaCl₂ and the clotting time (APTT) was recorded. For TT and PT assays, the mixture was first incubated for 2 min (PT) or 1 min (TT) at 37°C, before adding 200 µL of PT assay reagent (PT) or 100 µL of TT assay reagent (TT) and recording the clotting time (PT or TT). The negative control used in all the assays was 0.9% NaCl solution.

2.2.7. Assays of antithrombin-mediated inhibition of factors Xa and IIa (thrombin)

Stachrom ATIII and Stachrom Heparin kits (Stago, France) were used to assess antithrombin-mediated inhibition of factors Xa and IIa (thrombin), respectively. The antithrombin, factor Xa, thrombin, and substrates were prepared according to the manufacturer's instructions. Antithrombin was then diluted 1:2 in kit buffer at 1:10. Then 25 µL of seaweed extract aqueous solution at various concentrations were incubated with 25 µL of antithrombin (0.626 µg/µL) at 37°C for 30 seconds. Thereafter, 25 µL of factor Xa or factor IIa (thrombin) (11.25 nKat/mL) were added. After 30 seconds of incubation, 25 µL of a 3.25nM solution of the factor Xa chromogenic substrate (CBS 31.39; CH₂-SO₂-D-Leu-Gly-Arg-pNA, AcOH) or 25 µL of a 1.4nM solution of the factor IIa chromogenic substrate (CBS 61.50; EtM-SPro-ARG-pNA, AcOH) were added. Factor Xa or IIa (thrombin) activities were measured at 405 nm every 6 seconds for 5 minutes. The initial velocity was calculated as the slope of the linear segment of the kinetic curve. All assays were performed in 96-well NUNC microplates using a Fluostar Omega microplate reader.

2.2.8. Evaluation of the cell viability

Normal human dermal fibroblasts (NHDF) were obtained from ATCC, Product Code CCD-1059Sk (ATCC® CRL-2072™), Lot number 62062292 from the skin of a 20 years old woman, according to the furnisher's informations. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAN Biotech, Dutscher) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (PAN Biotech, Dutscher) and 1% of antibiotics: penicillin/streptomycin 10 000 U/10 mg/mL (v/v) (PAN Biotech, Dutscher). This was designated as the complete culture medium. The cells were cultivated in a temperature-controlled, humidified incubator with 5% CO₂ in 37°C. The cells were grown in 75 cm² surface ventilated culture flasks (BD

Falcon) and subcultured by trypsination (0.05% trypsin, PAN Biotech). The culture medium was changed every 2 or 3 days. Cells were used between the 3rd and 8th passages for the experiments.

The MTT test was used according to the method described by Mosmann. It is a colorimetric assay which allows to evaluate the cellular proliferation and is based on the reduction of tetrazolium salt (MTT) by living cells. The MTT, or (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) is a yellow salt. In the presence of mitochondrial succinate dehydrogenase of active living cells, the tetrazolium ring they contain is reduced and form a violet product: the formazan. The yellow solution becomes purple and the intensity of the purple coloration is proportional to the number of living cells.

Briefly, 100 µL of complete culture medium containing cells at 5×10^4 cells/mL were seeded in 96-wells plates (BD Falcon) and incubated during 24 hours; The medium was then removed and 100 µL of samples prepared in DMEM+1% of antibiotics or negative control (DMEM+1% of antibiotics) were added in the wells. After 48h, 25 µL of MTT (5% in PBS) were added in each well and the plates were incubated for 4 hours at 37°C. The media was then removed and 200 µL of dimethyl sulfoxide was added to each well, plates were incubated further 10 minutes and absorbance was read at 550 nm using a Fluostar Omega microplate reader.

3. Results and discussion

3.1. Extraction and sulfation procedure

ULVAN-01 was extracted from the green algae *Ulva sp.* in hot water and underwent a multi-step purification: ultrafiltration, ion exchange and precipitation of remaining proteins. After neutralization with NaOH, the sulfated polysaccharides were in a sodium salt form.

The extraction yield of the ulvans was of about 5% of the non-desalinated dry macroalgae that contained about 50% of salts (Figure 1).

The sulfation procedure was carried out on 500 mg of ULVAN-01 extract and 200 mg of ULVAN-02 were recovered

3.2. Chemical characterization of the ulvan extracts ULVAN-01 and ULVAN-02

The efficacy of the extraction and purification procedure of ulvans from *Ulva sp.* in terms of sulfated polysaccharide production was high as there was less than 4% of remaining contaminant proteins in ULVAN-01. The purity of the polysaccharide ULVAN-02 was even higher after chemical sulfation as the percentage of remaining proteins was less than 1% (table 1). The last step of the sulfation procedure, i.e. ethanol precipitation of sulfated polysaccharides, could be the cause of this further purification. Both ulvan extracts contained about 30% of uronic acids, a value which was in the higher range of a previous analysis of ulvans from *Ulva* species (Lahaye et al. 1999). Conversely, the sulfate content of ULVAN-01 was of 11%, a value which was in the lower range of previous studies on ulvans (Lahaye et al.

1999; Lahaye et Robic 2007). The chemical sulfation enabled to almost double ULVAN-01 sulfation, since ULVAN-02 contained 20% of sulfates (table 1). A very interesting feature of the extraction procedure developed by SEPROSYS was the high purity of the resulting ulvans that was around 87%.

Table 1: Chemical composition of ULVAN-01 and ULVAN-02

	Neutral sugars	Uronic acids	Sulfates	Proteins	Polyphenols	Lipids	Ashes
% (w/w _{dry extract})							
ULVAN-01	41	34	11	4	0	0	23
ULVAN-02	33	31	20	<1	0	0	nd

3.3. Structural characterization of the ulvan extracts ULVAN-01 and ULVAN-02

A molecular weight of about 56 kDa was estimated by gel permeation chromatography (Figure 2) for ULVAN-01 based on a calibration curve of dextran standards (table 2). After chemical sulfation of ULVAN-01 with sulfur trioxide pyridine complex in pyridine and DMF, ULVAN-02 was obtained. Its estimated molecular weight was of about 55 kDa, showing that the sulfation procedure had no impact on ULVAN-01 molecular weight (table 2).

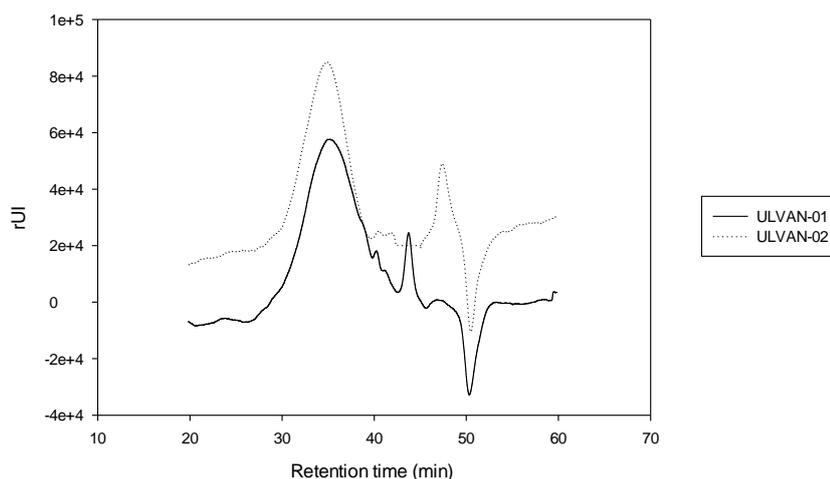


Figure 2: Gel permeation chromatography of the ulvan extracts ULVAN-01 and ULVAN-02.

Furthermore, the degree of polymerization (DP) and polydispersity index (I) were lower for ULVAN-02 than for ULVAN-01. This observation could probably be explained by the long dialysis step at the end of the sulfation procedure where small ulvans with a molecular weight lower than 1 kDa were lost (table 2).

Table 2: Structural characterization of ULVAN-01 and ULVAN-02.

	Mn (Daltons) = $\sum Ni * Mi/Ni$	Mw (Daltons) = $\sum Ni * Mi^2 / \sum Ni * Mi$	I
ULVAN-01	31,300	56,700	1.8
ULVAN-02	39,000	55,300	1.4

The ^{13}C NMR spectrum of ULVAN-01 is depicted in Figure 3. The chemical shifts were attributed on the basis of references reporting assignments of ulvans and oligosaccharides (Costa et al. 2012).

The signals assignments corresponding to the carbons of ulvanobiouronic acid 3-sulfate, involving a rhamnose moiety linked to either a glucuronic or an iduronic acid, were detected with a 3 ppm shift compared to the signals reported in a previous work on ulvans (Costa et al. 2012). Indeed, carbons of rhamnose (**R1** – 100.6 ppm, **R2** – 70.0 ppm, **R3**, **R4** – 79.1 ppm, **R5** – 69.1 ppm, **R6**) and glucuronic acid (**G1** – 104.1 ppm, **G2** – 74.8 ppm, **G3** – 76.0 ppm, **G4** – 79.8 ppm, **G5** – 77.1 ppm) that constitute type A ulvanobiouronic acid 3-sulfate were identified, as depicted in Figure 3. The chemical shifts attributed to rhamnose 3-sulfate linked to iduronic acid (**R'1** – 101.8 ppm, **R'2** – 70.0 ppm, **R'3** – 79.8 ppm, **R'4** – 77.6 ppm, **R'5** – 68.8 ppm, **R'6**) in type B ulvanobiouronic acid 3-sulfate, were also detected allowing to confirm the presence of this sequence. However, signals assigned to the carbons of iduronic acid were very weak.

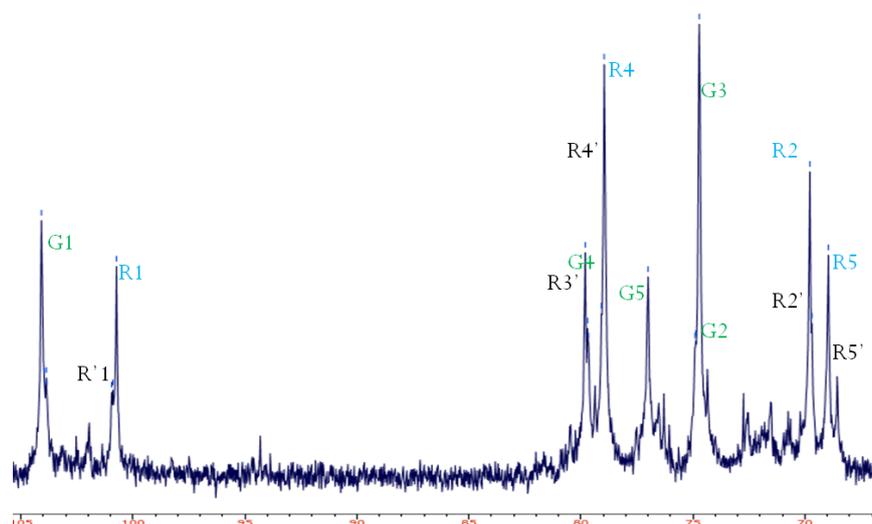
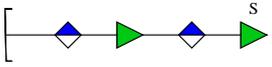
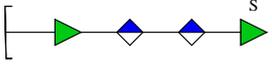
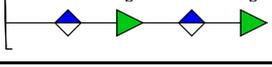
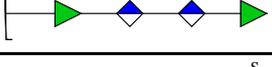
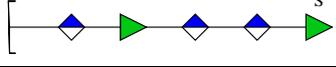
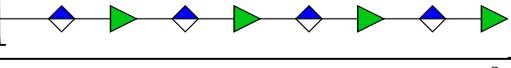
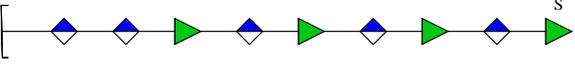
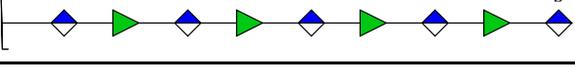
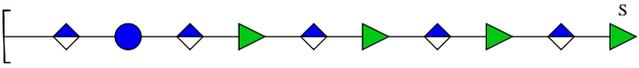
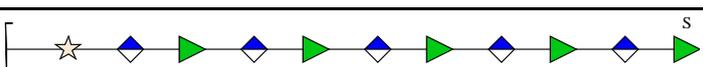
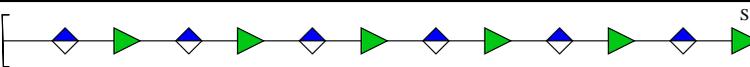
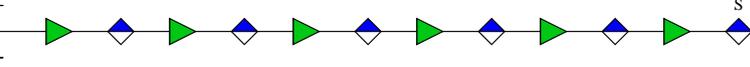
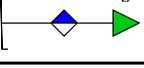
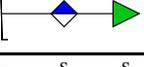
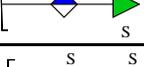
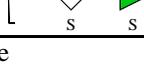


Figure 3: ^{13}C NMR spectrum of ULVAN-01 dissolved in D_2O , acquired for a minimum of 48 h. G correspond to the carbon signals of the glucuronic acid and R and R' refer to rhamnoses linked to glucuronic acid and iduronic acid, respectively. Numbers refer to the carbons of each residue.

Furthermore, the UHPLC-MSHR analyses of the depolymerized 9 kDa ulvans revealed distinctive ions corresponding to oligosaccharide sequences that could be determined by selective MS/MS fragmentation (Figure 4 and table 3).

Résultats, partie A.3.

Table 3: Oligosaccharide sequencing identified by Enchaînements oligosaccharidiques identifiés par UHPLC-MS/MS from ULVAN-01 (oligosaccharides 1-12) and ULVAN-02 (oligosaccharides 13-16).

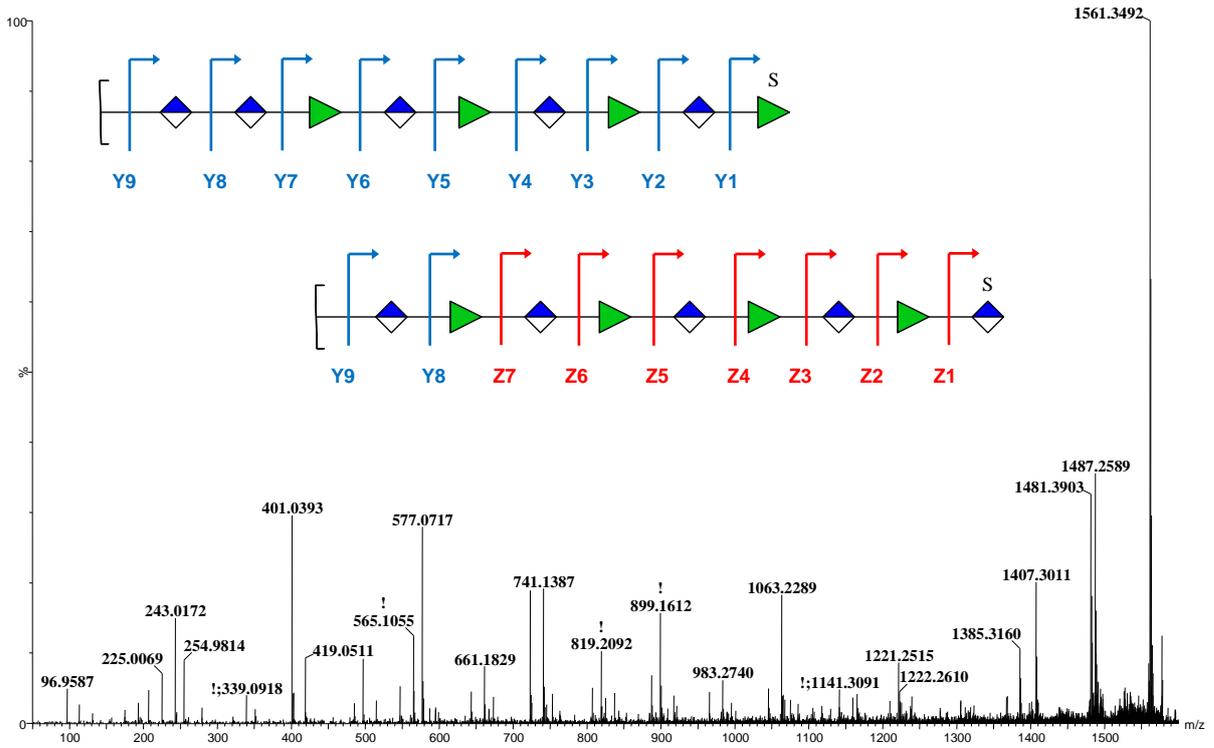
Oligosaccharide	Ion (m/z)	Ionization	Molecular formula	Resolution (ppm)	Symbolic representation of oligosaccharidic fragment ^(a) (CFG nomenclature ^(b))			
					 Rha	 GlcA (ou IdoA) ^(c)	 Glc (ou Gal) ^(c)	 Xyl
1	723,1286	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₂₄ H ₃₅ O ₂₃ S	0,55				
	741,1381	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₇ O ₂₄ S	2,02				
2	723,1286	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₂₄ H ₃₅ O ₂₃ S	0,55				
3	887,0420	[M-4H+3Na] ⁻	C ₂₄ H ₃₄ O ₂₇ S ₂ Na ₃	0,34				
4	887,0420	[M-4H+3Na] ⁻	C ₂₄ H ₃₄ O ₂₇ S ₂ Na ₃	0,34				
5	899,1594	[M-H ₂ O] ⁻	C ₃₀ H ₄₃ O ₂₉ S	1,89				
6	1487,2583	[M-2H+Na] ⁻	C ₄₈ H ₇₂ O ₄₇ S ₂ Na	1,28				
7	1561,3492	[M-H] ⁻	C ₅₄ H ₈₁ O ₅₀ S	1,60				
8	1561,3492	[M-H] ⁻	C ₅₄ H ₈₁ O ₅₀ S	1,60				
9	1723,4083	[M-H] ⁻	C ₆₀ H ₉₁ O ₅₅ S	2,26				
10	1839,4554	[M-H] ⁻	C ₆₅ H ₉₉ O ₅₈ S	1,96				
11	2029,5049	[M-H] ⁻	C ₇₂ H ₁₀₉ O ₆₄ S	2,66				
12	2029,5049	[M-H] ⁻	C ₇₂ H ₁₀₉ O ₆₄ S	2,66				
13	401,0385	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₁₂ H ₁₇ O ₁₃ S	1,25				
14	502,9772	[M-2H-H ₂ O+Na] ⁻	C ₁₂ H ₁₆ O ₁₆ S ₂ Na	1,19				
15	604,9165	[M-3H-H ₂ O+2Na] ⁻	C ₁₂ H ₁₅ O ₁₉ S ₃ Na ₂	0,17				
16	706,8561	[M-4H-H ₂ O+3Na] ⁻	C ₁₂ H ₁₄ O ₂₂ S ₄ Na ₃	0,99				

^(a) Identified ions correspond to oligosaccharides fractions derived from non targeted fragmentation in the ionization source of the mass spectrometer.

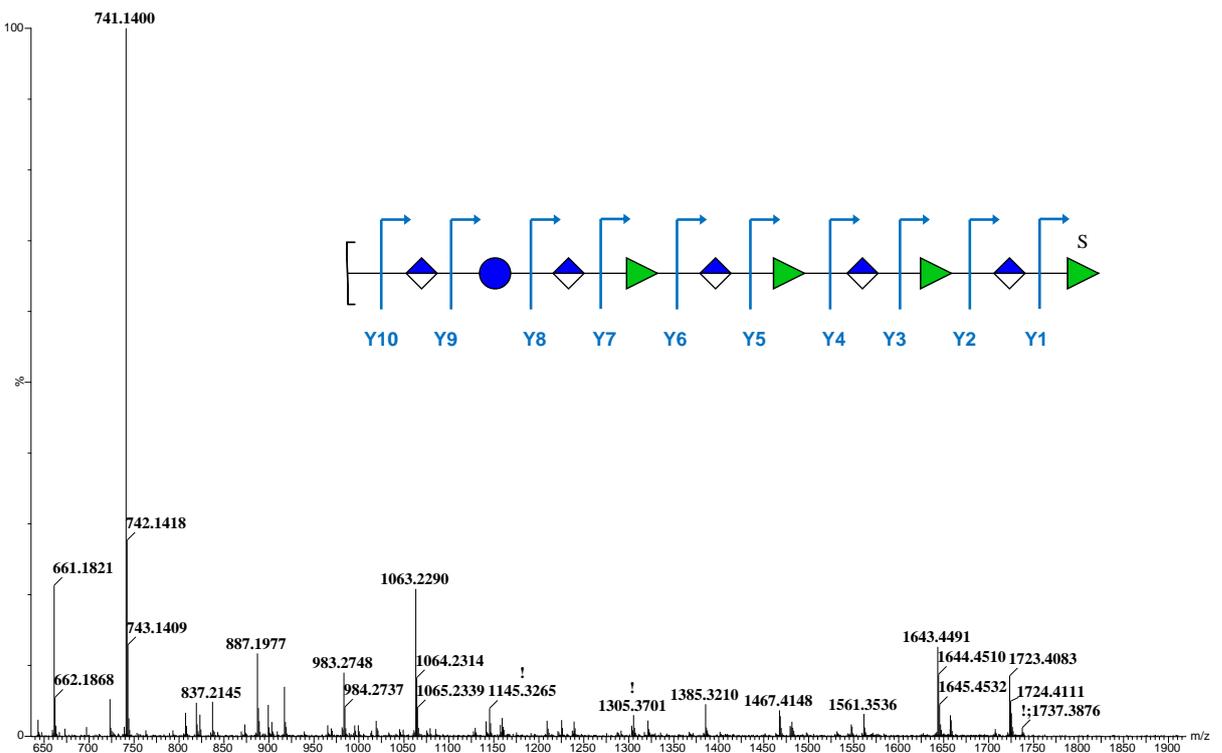
^(b) Consortium for Functional Glycomics.

^(c) GlcA et IdoA résidues, as well as Glc and Gal, are isomers and therefore are impossible to distinguish with MS analysis: symbols used for GlcA et Glc can therefore correspond to IdoA et Gal, respectively, monosaccharides that can be found in ulvans, even though in smaller proportions.

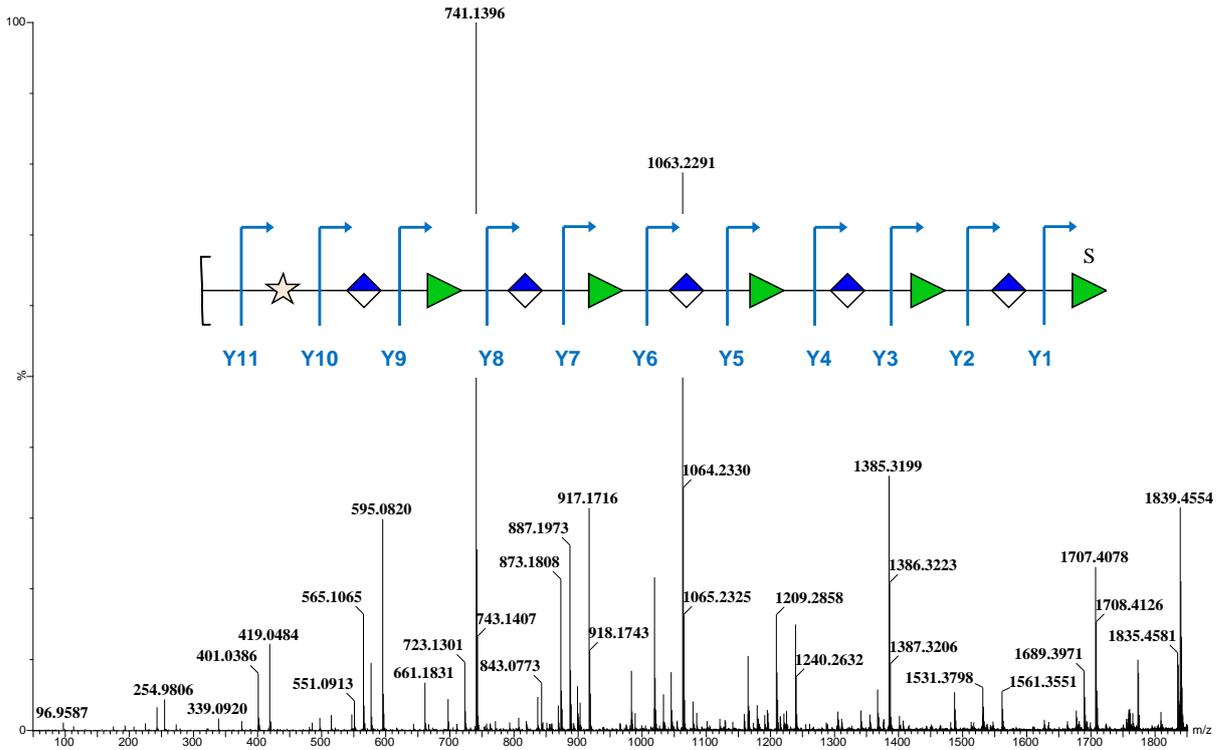
A



B



C



D

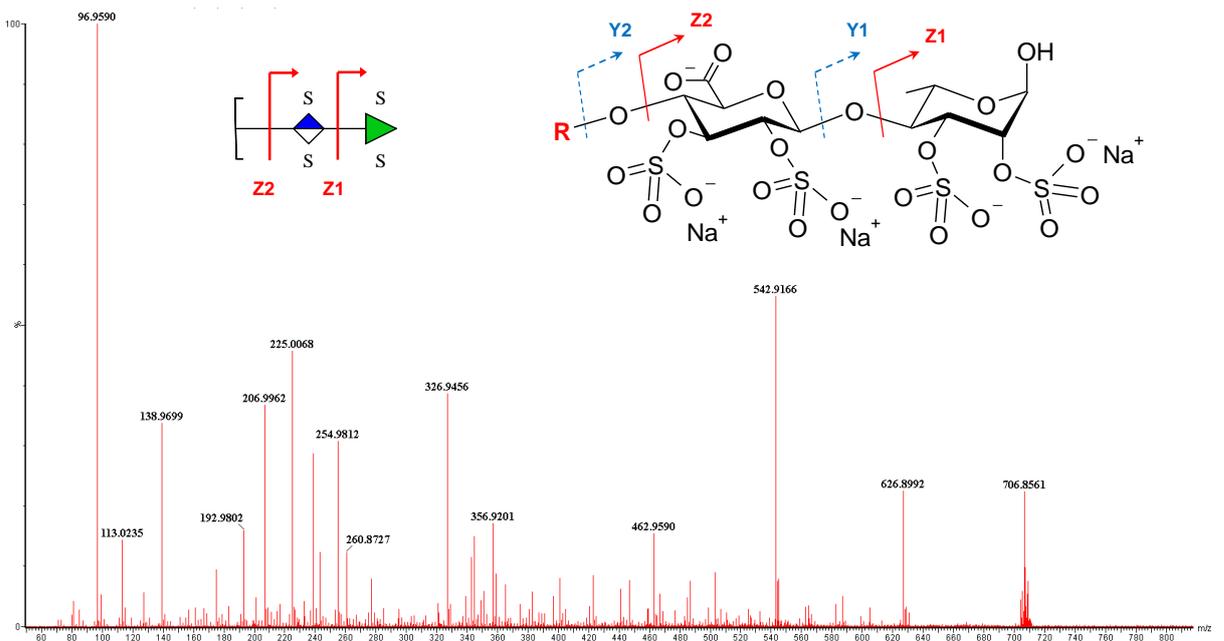


Figure 4: Negative-ion mode ESI-MS/MS spectrum of the ions (m/z) 1561,3492 (A), 1723,4083 (B), 1839,4554 (C) et 706,8561 (D). Identified oligosaccharides are symbolized according to the GFC (Consortium for Functional Glycomics) nomenclature: \blacktriangle Rha, \blacklozenge GlcA (or IdoA) \bullet Glc (or Gal) \star Xyl. Those representations were obtained using the software logiciel Glycoworkbench (Ceroni et al. 2007).

Résultats, partie A.3.

Tableau 4: Fragmentation profiles identified from the ESI-MS/MS spectra of ions (m/z) 1561,3492 (Figure 24A), 1723,4083 (Figure 24B), 1839,4554 (Figure 24C) et 706,8561 (Figure 24D).

Fragmented parent ion (m/z)	Cut ^(a)	Fragment ion (m/z)	Ionization	Molecular formula	Resolution (ppm)
1561,3492 ^(b)	Y1	243,0172	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₁ O ₈ S	1,23
	Y2	419,0511	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₄ S	3,58
	Y3 – SO ₃	485,151	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₅	0,82
	Y3	565,1055	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₈ S	3,54
	Y4	741,1387	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₇ O ₂₄ S	1,08
	Y5	887,1956	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₇ O ₂₈ S	2,14
	Y6	1063,2289	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₅ O ₃₄ S	0,56
	Y7	1209,2906	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₅ O ₃₈ S	2,56
	Y8	1385,316	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₃ O ₄₄ S	2,53
	Y9	1561,3492	[M-H] ⁻	C ₅₄ H ₈₁ O ₅₀ S	1,60
1561,3492 ^(b)	Z1	254,9814	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₆ H ₇ O ₉ S	1,18
	Z2	401,0393	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₁₂ H ₁₇ O ₁₃ S	0,75
	Z3	577,0717	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₁₈ H ₂₅ O ₁₉ S	1,04
	Z4	723,1296	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₂₄ H ₃₅ O ₂₃ S	0,83
	Z5 – SO ₃	819,2092	[M-H-H ₂ O-SO ₃] ⁻	C ₃₀ H ₄₃ O ₂₆	5,98
	Z5	899,1612	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₃₀ H ₄₃ O ₂₉ S	0,11
	Z6	1045,2198	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₃₆ H ₅₃ O ₃₃ S	0,77
	Z7	1221,2515	[M-H-H ₂ O] ⁻	C ₄₂ H ₆₁ O ₃₉ S	0,33
	Y8	1367,3013	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₁ O ₄₃ S	5,63
	Y9	1561,3492	[M-H] ⁻	C ₅₄ H ₈₁ O ₅₀ S	1,60
1723,4083	Y1	243,0179	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₁ O ₈ S	1,65
	Y2 – SO ₃	339,0927	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₁	0,00
	Y2	419,0478	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₄ S	4,30
	Y3 – SO ₃	485,1524	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₅	3,71
	Y3	565,1076	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₈ S	0,18
	Y4 – SO ₃	661,1821	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₇ O ₂₁	0,91
	Y4	741,1400	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₇ O ₂₄ S	0,67
	Y5 – SO ₃	807,2402	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₇ O ₂₅	0,62
	Y5	887,1977	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₇ O ₂₈ S	0,23
	Y6 – SO ₃	983,2748	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₅ O ₃₁	2,14
	Y6	1063,2290	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₅ O ₃₄ S	0,47
	Y7 – SO ₃	1129,3344	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₅ O ₃₅	3,36
	Y7	1209,2825	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₅ O ₃₈ S	4,13

Résultats, partie A.3.

	Y8 – SO ₃	1305,3701	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₃ O ₄₁	5,67
	Y8	1385,3210	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₃ O ₄₄ S	1,08
	Y9	1547,3717	[M-H] ⁻	C ₅₄ H ₈₃ O ₄₉ S	0,39
	Y10 – SO ₃	1643,4491	[M-H] ⁻	C ₆₀ H ₉₁ O ₅₂	0,91
	Y10	1723,4083	[M-H] ⁻	C ₆₀ H ₉₁ O ₅₅ S	2,26
1839,4554	Y1	243,0177	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₁ O ₈ S	C1
	Y2 – SO ₃	339,092	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₁	C2 – SO ₃
	Y2	419,0484	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₄ S	C2
	Y3	565,1065	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₈ S	C3
	Y4	741,1396	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₇ O ₂₄ S	C4
	Y5	887,1973	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₇ O ₂₈ S	C5
	Y6	1063,2291	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₅ O ₃₄ S	C6
	Y7	1209,2855	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₅ O ₃₈ S	C7
	Y8	1385,3199	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₃ O ₄₄ S	C8
	Y9	1531,3798	[M-H] ⁻	C ₅₄ H ₈₃ O ₄₈ S	C9
	Y10	1707,4078	[M-H] ⁻	C ₆₀ H ₉₁ O ₅₄ S	C10
	Y11	1839,4554	[M-H] ⁻	C ₆₅ H ₉₉ O ₅₈ S	C11
706,8561	Groupement sulfo	96,959	HSO ₄ ⁻	HO ₄ S	6,19
	Z1 – SO ₃ Na + H	225,0068	[M-H-H ₂ O-SO ₃] ⁻	C ₆ H ₆ O ₇ S	0,44
	Z1	326,9456	[M-2H-H ₂ O+Na] ⁻	C ₆ H ₈ O ₁₀ S ₂ Na	0,31
	Z2 – COOH – SO ₃ Na – SO ₃	462,959	[M-3H-H ₂ O-COO-2SO ₃ +2Na] ⁻	C ₁₁₁ H ₁₃ O ₁₃ S ₂ Na ₂	0,86
	Z2 – COOH – SO ₃ Na	542,9166	[M-3H-H ₂ O-COO-SO ₃ +2Na] ⁻	C ₁₁ H ₁₃ O ₁₆ S ₃ Na ₂	0,74
	Z2 – SO ₃	626,8992	[M-4H-H ₂ O-SO ₃ +3Na] ⁻	C ₁₂ H ₁₄ O ₁₉ S ₃ Na ₃	0,96
	Z2	706,8561	[M-4H-H ₂ O+3Na] ⁻	C ₁₂ H ₁₄ O ₂₂ S ₄ Na ₃	0,99

^(a) Par convention, les coupures de types Y et Z correspondent à des fragmentations de part et d'autre de la liaison O-glycosidique pour lesquelles la charge ionisante se dirige vers l'extrémité réductrice de l'ion parent fragmenté, Y étant la coupure la plus éloignée et Z la plus proche de cette extrémité réductrice (voir Figure 24D pour exemple).

^(b) L'ion 1561,3492 m/z présente deux profils de fragmentation différents correspondant à deux enchaînements oligosaccharidiques distincts.

These fragmentation profiles led to the characterization of oligosaccharide sequences with a polymerization degree up to 12 (Figure 4 and table 3). Figure 4 displays 3 characteristic MS/MS profiles of ions (m/z) 1561.3492 (Figure 4A), 1723.4083 (Figure 4B) and 1839.4554 (Figure 4C). The typical structure of ulvans was found for ULVAN-01, namely a repeated disaccharide sequence, sulfated or not, composed of a rhamnose moiety and an uronic acid (glucuronic or iduronic): glucuronic and iduronic acids are epimers and could not be differentiated by MS/MS analysis (Figure 4A).

Moreover, this sequence was shown to be interrupted by a glucose (or possibly a galactose since these epimers cannot be distinguished by MS/MS analysis) or a xylose residue (Figures 4B and 4C). These monosaccharides were quite infrequent (1/10 or 1/11 at the most) but in

agreement with the osidic composition of ulvans (Lahaye et Robic 2007). Furthermore, this MS/MS analysis showed that two uronic acids could also be linked (Figure 4A) but only once on 9 moieties.

All together, ^{13}C NMR and MS/MS analyses confirmed the biochemical composition of ULVAN-01 that highlighted a high proportion of neutral sugars and uronic acids and were in agreement with previous works reporting the structure of ulvans, which showed that the major repeated disaccharide unit of ulvans is an ulvanobiouronic acid 3-sulfate containing mainly glucuronic acid (type A: $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlucAp-(1,4)-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow\text{)}_n$) or less frequently (1,1-9,1%), iduronic acid (type B: $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoAp-(1,4)-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow\text{)}_n$) (Marc Lahaye et Robic 2007). The regio- and stereo-specificities of the osidic linkages could not be determined from these analyses so the structures reported on Figure 3 were designed according to the established structure of ulvans.

The MS/MS analysis also highlighted the chemical sulfation method impact on ULVAN-01 to obtain ULVAN-02. The four obtained dissaccharides demonstrated that, after sulfation, sulfates groups could be found on both rhamnose and uronic acid moieties and that the number of sulfate groups was up to two on the residues. This result proved that the sulfation method used was completely aleatory and that it could sulfate up to the entirety of the two free alcohols of the rhamnose or the uronic acid (GlcA or IdoA).

Furthermore, considering the sulfate rate of ULVAN-02, around 20%, that is to say an average sulfation of two sulfate groups each three residues and the observation of disaccharides with up to four sulfate groups, it meant that there probably was, after chemical sulfation, hyper-sulfated as well as scarcely sulfated zones within the polysaccharidic structure of ULVAN-02.

3.4. Anticoagulant activity

The potential anticoagulant activity of ULVAN-01 and ULVAN-02 was investigated using different assays, from the specific antithrombin-dependent pathway (anti-Xa and anti-IIa) to the intrinsic and/or common (Activated Partial Thromboplastin Time, APTT), extrinsic (Prothrombin Time, PT) or common (Thrombin Time, TT) anticoagulant pathways. Furthermore, the anticoagulant properties of the extracts were compared to those of commercial anticoagulants, heparin and Lovenox[®].

3.3.1. Clotting time assays

The APTT test mainly assesses the anticoagulant activity on the intrinsic pathways, and, to a lesser extent, the common pathway.

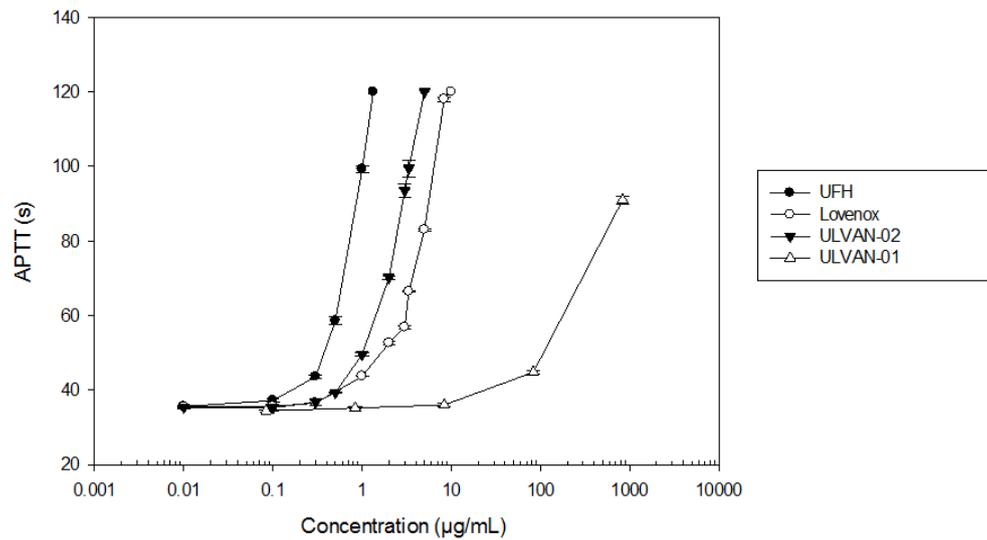


Figure 5: APTT assay of the anticoagulant activity of ULVAN-01 and ULVAN-02. The clotting time of the plasma in the absence of extracts (negative control, 0.9% NaCl) was 38.2 s. The maximum clotting time measured by the coagulometer for this assay was 120 s (no coagulation within this time range).

The activity of ULVAN-01 on the intrinsic pathway was very low (Figure 5). Indeed, for a concentration of $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the clotting time of the plasma was lower than 100 seconds, i.e. it was 100 and 1,000 times higher than Lovenox® and UFH, respectively. Conversely, after sulfation, ULVAN-02 showed a very interesting anticoagulant activity that was higher than that of Lovenox® and just slightly lower than that of UFH. While $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ULVAN-01 extract were needed to double the clotting time, only $2.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of ULVAN-02 were needed: this concentration was two times lower than that of Lovenox® ($4.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (table 4) and only three times higher than that of UFH. ULVAN-02 was thus more effective than Lovenox® on the intrinsic pathway.

Therefore, the chemical sulfation procedure significantly increased the activity of ULVAN-01 extract on the intrinsic and/or common coagulation pathways. Several species of green macroalgae have been studied for their sulfated polysaccharides and anticoagulant activity and have mainly shown that their sulfated polysaccharides could extend the clotting time in the APTT test, including high arabinose-containing sulfated polysaccharides, arabinogalactans or galactans found in *Codium* species (Siddhanta et al. 1999; Shanmugam, Mody, et Siddhanta 2001; Ciancia et al. 2007) or *Enteromorpha* (Qi et al. 2012; X. Wang et al. 2013), polysaccharides rich in sulfated galactose from *Caulerpa* (Gurgel Rodrigues et al. 2011) and high-rhamnose-containing sulfated polysaccharides from *Monostroma* (Zhang et al. 2008; Mao et al. 2009; Li et al. 2011, 2012). The study by Mao (Mao et al. 2006) is the only one on the anticoagulant activity of sulfated rhamnans extracted from an *Ulva* species. The ulvans that they extracted from *Ulva conglobata* were highly sulfated (between 23.04 and 35.2%) with a rhamnose content between 63 and 72%. Their study has shown that their extracts had a significant APTT activity, and the extract containing 35.2% of sulfates was the most effective with a clotting time extended to 120 seconds at a concentration of $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for extracts with 23 and 28% of sulfation, respectively. For the

same clotting time in the APTT test, the required concentration of the modified polysaccharide, ULVAN-02 (sulfated at 20%), was of $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, thus similar to the activity observed with the ulvans from *Ulva congregata* which were naturally highly sulfated compared to the ulvans from *Ulva lactuca* that we studied.

The PT test, assessing the extract activity on the extrinsic coagulation pathway, also showed a major effect of the sulfation procedure on the polysaccharide activity. Indeed, ULVAN-01 was inactive on this coagulation pathway whereas the activity of the sulfated extract ULVAN-02 was high and only 3 times lower than that of UFH (Figure 6). ULVAN-02 was more than ten times more active than Lovenox®, with respective concentrations needed to double the clotting time of 45 and $480 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (table 4). This finding did not support previous studies on sulfated polysaccharides from green macroalgae, including from *Codium* (Jurd et al. 1995; Matsubara et al. 2001; N. Li et al. 2015), *Monostroma* (Zhang et al. 2008; Mao et al. 2008; Mao et al. 2009; Li et al. 2011), *Caulerpa* (Costa et al. 2012) and *Enteromorpha* (Qi et al. 2012) species, that have concluded that sulfated polysaccharides had a positive effect on the intrinsic and/or common coagulation pathways based on the APTT test while they had no activity on the extrinsic coagulation pathway based on the PT test.

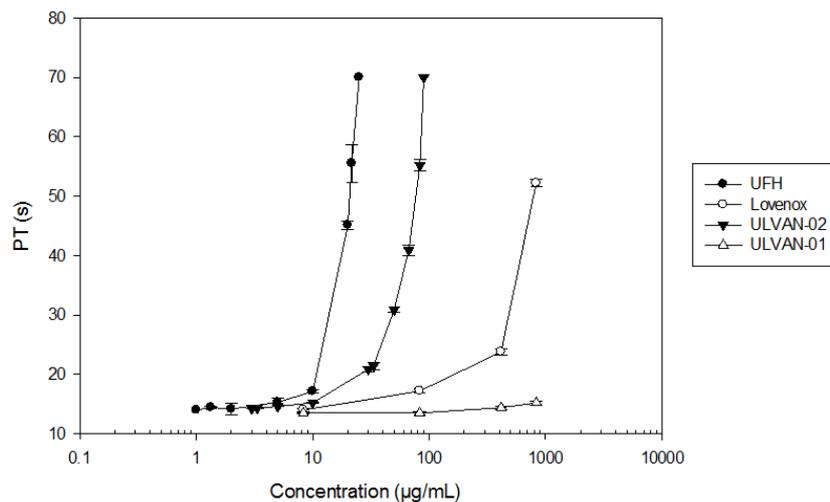


Figure 6: PT assay of the anticoagulant activity of ULVAN-01 and ULVAN-02. The clotting time of the plasma in the absence of extracts (negative control, 0.9% NaCl) was 13.1 s. The maximum clotting time measured by the coagulometer for this assay was 70 s (no coagulation within this time range).

All these results confirm previous findings showing that the anti-coagulant activity of macroalgal sulfated polysaccharides is largely affected by their degree of sulfation but also by the osidic composition, molecular weight (Nishino, Aizu, et Nagumo 1991a) and sulfate groups position (Pereira, Mulloy, et Mourão 1999; Melo et al. 2004) which are other significant features of the anti-coagulant activity of sulfated polysaccharides.

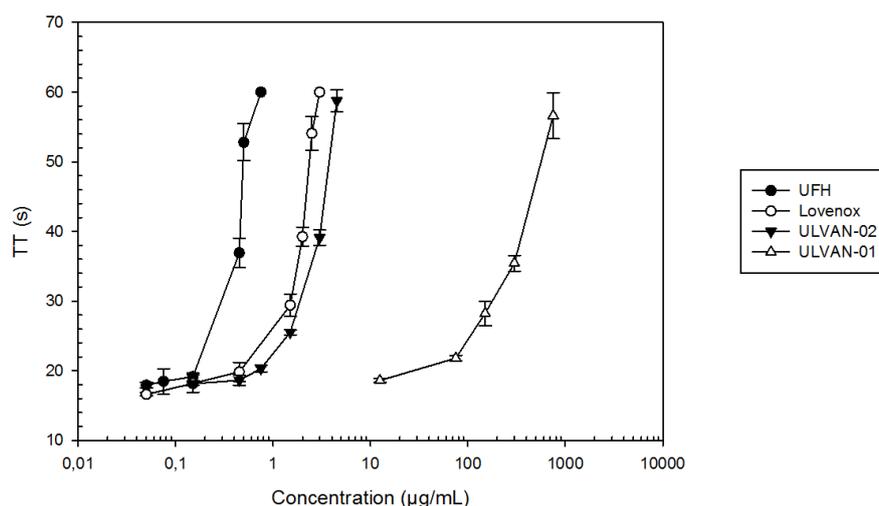


Figure 7: TT assay of the anticoagulant activity of ULVAN-01 and ULVAN-02. The clotting time of the plasma in the absence of extracts (negative control, 0.9% NaCl) was 12.9 s. The maximum clotting time measured by the coagulometer for this assay was 60 s (no coagulation within this time range).

Furthermore, a significantly increased anticoagulant activity was observed with the TT assay, which evaluates the anticoagulant activity on the common pathway of the coagulation process, after chemical sulfation (Figure 7). Indeed, the concentration of ULVAN-01 needed to achieve the same coagulation time was more than 40 times higher than that of ULVAN-02. However, ULVAN-02 activity on this coagulation pathway was slightly lower than that of Lovenox[®], which was not the case on the other coagulation pathways. Lovenox[®] was more active than ULVAN-02 on the TT assay but this difference was low. Thus, for the common pathway, the chemical sulfation procedure led to a significantly increased anticoagulant activity of ulvans from *Uva sp.*. Indeed, the concentration needed to double the coagulation time of the negative control decreased by 40 after chemical sulfation, from 117 µg.mL⁻¹ to 2.6 µg.mL⁻¹ (table 4).

Overall, these results showed that ULVAN-02 anticoagulant activity was higher in the early steps of the coagulation cascade, both on the intrinsic and extrinsic pathways, compared to its activity on the common pathway, which is the final coagulation with the fibrin complex formation (red thrombus).

Then, the extract activity on two central enzymes of the coagulation process was measured: the factor Xa and factor IIa (or thrombin). The anticoagulant activity was measured in the presence (or absence) of antithrombin, a coagulation inhibitor. UFH and Lovenox[®] are known for their antithrombin-mediated anticoagulant activity.

3.3.2. Antithrombin-mediated inhibition of factors Xa and IIa:

ULVAN-01 was devoid of any antithrombin-mediated anti-Xa activity (no activity at 1000 µg.mL⁻¹, data not shown) while ULVAN-02 showed a maximal activity at a concentration of

Résultats, partie A.3.

100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figure 8). However, although the antithrombin-mediated anti-Xa activity of sulfated polysaccharides was much higher than that of ULVAN-01, ULVAN-02 activity was 100 times lower than that of UFH and Lovenox[®]. Indeed, the factor Xa residual activity was of 50% for UFH, Lovenox[®] and ULVAN-02 concentrations of 0.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 0.125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 17.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively (table 4). The lack of antithrombin-mediated anti-Xa activity of the native ulvan, ULVAN-01, is in line with the study by Mao et al (Mao et al. 2008) which has concluded that rhamnan sulfates from *Monostroma nitidum* had a very low antithrombin-mediated anti-Xa activity (concentration greater than 1,000 times that of heparin for the same activity). These results were obtained for two sulfated rhamnan extracts with molecular weights of 70 kDa and 870 kDa containing 34.4% and 28.2% of sulfates, respectively, a content which is therefore much higher than that of ULVAN-01 and ULVAN-02 (10% and 20%, respectively). The study by Majdoub and al (Majdoub et al. 2009) on sulfated rhamnans (20% of sulfates) from the green algae *Arthrospira platensis* has also shown a lack of anti-Xa activity of the polysaccharide. In ULVAN-02, the proportion of sulfates was 10% lower than that of sulfated rhamnans described by Mao et al. but the concentration needed to achieve a similar antithrombin-mediated activity was 10 times lower. Conversely, Matsubara et al (Matsubara et al. 2001) have studied the anticoagulant activity of sulfated galactans extracted from the green seaweed *Codium cylindricum* and shown that the activity of their polysaccharides containing 89% of galactose and 13.1% of sulfates was very similar to that found here in ULVAN-02.

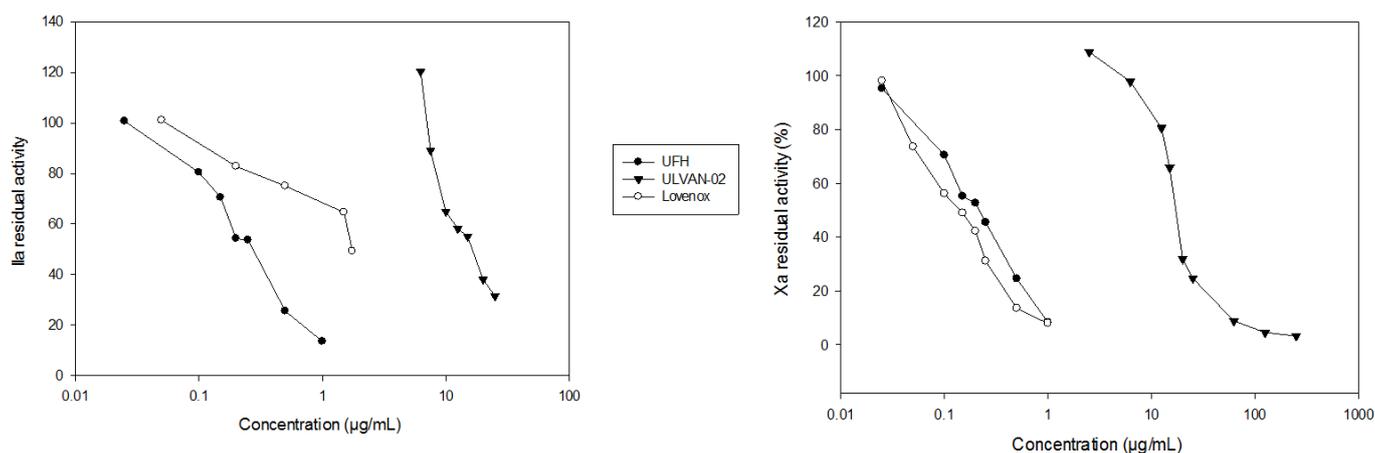


Figure 8: Dose-response curves of antithrombin-mediated anti-Xa (A) and anti-IIa (B) activities of sulfated polysaccharides.

In addition to the anti-Xa activity, the antithrombin-mediated anti-IIa activity of ULVAN-02 was 100 times lower than that of UFH while ULVAN-01 had no antithrombin-mediated anti-IIa activity (data not shown). Lovenox[®] activity was higher than that of ULVAN-02 but much lower than that of UFH. The extract concentration needed for a residual enzymatic activity of 50% was 0.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for UFH, 1.75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for Lovenox[®] and 18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for ULVAN-02 (table 3). This finding was consistent with the known anticoagulant effect of Lovenox[®] since it targets factor Xa. Our results supported those obtained with other sulfated rhamnans from green macroalgae where the polysaccharides were able to inhibit thrombin in

the presence of antithrombin but to a lesser extent than heparin. Also, studies on rhamnose-rich polysaccharides from *Monostrom nitidum* (Mao et al. 2008) and *Arthrospira platensis* (Majdoub et al. 2009) have concluded that heparin was about 10 times more active than sulfated polysaccharides, Mao has shown a factor 100 between the active concentrations of heparin and ulvans (Mao et al. 2006).

Table 4: Analysis of the anticoagulant activity of ULVAN-01 and ULVAN-02

	Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	UFH	Lovenox [®]	ULVAN-01	ULVAN-02
APTT ^(a)	0.75	4.7	500	2.4
PT ^(a)	14.25	480	inactive	45
TT ^(a)	0.45	1.82	117	2.62
anti-Xa ^(b)	0.2	0.125	inactive	17.5
anti-IIa ^(b)	0.25	1.75	inactive	18

^(a) Extract concentration needed to double the clotting time compared to the negative control (0.9% NaCl)

^(b) Extract concentration for which the enzyme maintained 50% of residual activity

Overall, all tests showed a highly significant increase in anticoagulant activity after sulfation of ulvans extracted from *Ulva sp.*.

3.5. Effect of ULVAN-01 and ULVAN-02 on cell viability

The *in vitro* cytotoxicity of ULVAN-01 and ULVAN-02 was evaluated by MTT and compared to that of UFH and Lovenox[®] (Figure 9).

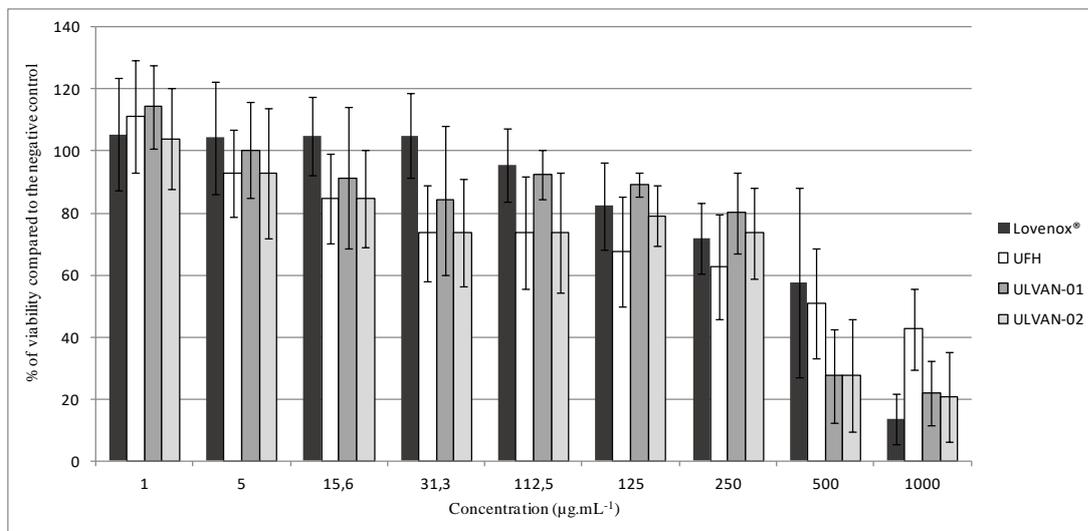


Figure 9: % of viability of fibroblasts treated during 72 hours with Lovenox[®], UFH, ULVAN-01 and ULVAN-02 compared to the negative control

The results showed that ULVAN-01, ULVAN-02 and UFH had a very similar dose-response effect on the cell viability. Up to 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, these three extracts had a very limited impact on the cell number, around 80% compared to the number of cells in the negative control. Lovenox[®] seemed to have even a little less impact on the cell number than the other polysaccharides, that could be explained by its low molecular weight.

Those results showed that ULVAN-02 had no cytotoxicity on human fibroblasts at the concentrations where they were bioactives.

Conclusion

We developed a solvent- and acid-free procedure to extract ulvans from *Ulva sp.*. The extract purity was high with less than 4% of remaining at the end of the procedure. The degree of ulvan sulfation of 11% was quite low, which was in the lower sulfation range previously found with *Ulva* algae. Data on the anticoagulant activity of ulvans are limited but previous studies of other types of sulfated polysaccharides have shown that sulfation was essential for the anticoagulant activity, even if the osidic composition, molecular weight and sulfate group position were also important features in the anti-coagulant activity of sulfated polysaccharides (M. S. Pereira, Mulloy, et Mourão 1999; Melo et al. 2004). To investigate the importance of the degree of sulfation of ulvans from *Ulva sp.*, the polysaccharides underwent a chemical sulfation that allowed almost doubling the degree of the native polysaccharide (from 11% to 20%). The results were really positive in terms of anticoagulant activity with an increase in all coagulation pathways and in anti-Xa and IIa activity, with an antithrombin-mediated inhibition. The activity of sulfated polysaccharides after chemical sulfation was more significant on the intrinsic and extrinsic pathways, with an activity higher than that of Lovenox[®] and close to that of UFH. Regarding the common pathway, the activity on the transformation of fibrinogen into fibrin was also interesting, although it was slightly lower than that of the commercial anticoagulants. The antithrombin-mediated activity on Xa and IIa was also significantly increased after chemical sulfation but remained quite low compared to UFH and Lovenox[®]. Therefore, ULVAN-02 could be a very interesting alternative to heparins, with different targets and a high anti-coagulant activity.

Acknowledgements:

We are very grateful to La Rochelle Hospital, France that kindly provided us Lovenox[®], and to the “Association nationale de la recherche et de la technologie”, for their contribution to this work by providing a part of a PhD funding.

A.4. Discussion générale

Dans cette première partie, nous avons étudié le potentiel d'extraits aqueux de macroalgues avec des degrés de purification différents comme anti-coagulants.

Dans la première sous-partie, l'objectif était d'étudier le potentiel anti-coagulant d'extraits aqueux de six macroalgues comestibles trouvées communément sur les côtes françaises : *Himanthalia elongata*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Laminaria digitata* pour les macroalgues brunes, *Chondrus crispus* pour les macroalgues rouges et *Ulva sp.* pour les macroalgues vertes afin de sélectionner les algues intéressantes pour la suite de l'étude.

Dans la deuxième sous-partie, les algues choisies ont été soumises au procédé SEPROYS[®] afin d'extraire et de purifier leurs polysaccharides sulfatés et étudier leur activité anti-coagulante.

Des extraits aqueux avec des activités diverses

L'analyse de l'activité anti-coagulante des extraits aqueux a été réalisée par deux types de tests : des tests enzymatiques ciblant les deux enzymes centrales de la coagulation : la thrombine (IIa) et le facteur Xa ainsi que des tests de coagulométrie plus larges, mesurant l'activité anti-coagulante sur les trois voies centrales de la coagulation.

Tableau IX : Activité anticoagulante des extraits aqueux de macroalgues (résultats publication A.2.)

	Concentration des extraits ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	Activité Xa résiduelle ^(a)	Activité IIa résiduelle ^(b)	aPTT ^(b)	PT ^(b)	TT ^(b)
<i>Himanthalia elongata</i>	468	258	32.1	814	< 125
<i>Laminaria digitata</i>	169	2.6	19.6	492	< 125
<i>Ascophyllum nodosum</i>	79	7.5	32	440	< 125
<i>Fucus vesiculosus</i>	313	> 1000	18.5	327	< 125
<i>Ulva lactuca</i>	> 500	> 1000	> 83	> 830	< 125
<i>Chondrus crispus</i>	253	194	21	> 415	< 125
Héparin	0.20	0.25	0.7	16	< 1.25
Lovenox [®]	0.15	1.8	4.5	495	< 1.25

^(a) Concentration en extrait inhibant 50% de l'activité résiduelle des facteurs de la coagulation (IC_{50})

^(b) Concentration en extrait permettant de doubler le temps de coagulation du témoin négatif (NaCl 0.9%)

Dans l'ensemble, l'activité anti-Xa antithrombine-dépendante de tous les extraits est **relativement faible** par rapport aux témoins positifs que sont le Lovenox[®] et l'héparine NF. L'extrait avec la meilleure activité anti-Xa est l'extrait d'*Ascophyllum nodosum*. Il inhibe l'activité du facteur Xa avec une IC_{50} proche de $79 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tandis que le Lovenox[®] et l'héparine NF présentent des IC_{50} bien plus faibles, respectivement de 0,15 et $0,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Les résultats sont assez **similaires pour l'activité anti-IIa antithrombine-dépendante**. La plupart des extraits sont en effet assez peu actifs en comparaison de l'héparine NF (IC₅₀ de 0,25 µg.mL⁻¹), et même du Lovenox[®] (IC₅₀ de 1,8 µg.mL⁻¹), dont la cible principale est pourtant le Xa et non la thrombine. Deux extraits présentent toutefois une activité plutôt intéressante : l'extrait de *Laminaria digitata*, le plus actif, présentant un IC₅₀ de 2,6 µg.mL⁻¹ et l'extrait d'*Ascophyllum nodosum* avec un IC₅₀ de 7,5 µg.mL⁻¹, tous deux riches en fucose sulfaté.

Pour les tests de coagulométrie, qui analysent les activités anti-coagulantes des extraits aqueux sur les trois grandes voies de la coagulation *in vitro*, les résultats suggèrent que les extraits sont **les plus actifs sur le test aPTT**, correspondant à la **voie intrinsèque et/ou commune de la coagulation**. En effet, les résultats du test TT, c'est à dire le potentiel anticoagulant sur la voie commune de la coagulation, montrent que tous les extraits présentent une activité similaire, avec, pour obtenir une activité équivalente à celle de l'héparine NF ou du Lovenox[®], une concentration en extraits plus de 100 fois supérieure.

Pour ce qui est de l'activité sur la voie extrinsèque, mesurée par le test PT, les extraits de *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Chondrus crispus* sont capables de doubler le temps de coagulation du témoin négatif (NaCl 0.9%) pour des concentrations respectives de 492, 440, 327 et autour de 415 µg.mL⁻¹, c'est-à-dire des valeurs très proches, voire inférieures à celle du Lovenox[®] (495 µg.mL⁻¹) mais beaucoup plus importante que celle de l'héparine NF (0.7 µg.mL⁻¹).

Les extraits de *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* et *Chondrus crispus* sont parmi les plus actifs et présentent des activités anti-coagulantes similaires sur le test TCA, avec des concentrations de 19,6, 18,5 and 21 µg.mL⁻¹ permettant de doubler le temps de coagulation par rapport au témoin négatif (NaCl 0,9%). Ces concentrations sont en effet dans une gamme de concentration **seulement 5 fois plus élevée que le Lovenox[®]** (4,5 µg/mL⁻¹). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur des polysaccharides bruts extraits de *Fucus vesiculosus* et *Laminaria brasiliensis*, par Pereira et al. (Pereira, Mulloy, et Mourão 1999) qui ont montré que les fucoïdanes extraits de ces algues brunes présentaient des effets anti-coagulants intéressants sur le TCA, et en particulier pour l'extrait de *Laminaria brasiliensis* et d'autres études concluant que les polysaccharides sulfatés extraits de macroalgues brunes et rouges agissaient principalement sur la voie intrinsèque et/ou commune (test TCA) plutôt que sur la voie extrinsèque (PT) (Melo et al. 2004; Wang et al. 2010; Gómez-Ordóñez, Jiménez-Escrig, et Rupérez 2014).

Une activité anti-coagulante des extraits aqueux dépendante de différents facteurs structurels

De nombreuses études ont démontré que les polysaccharides possédant les **plus hauts taux de sulfates** présentaient souvent la meilleure activité anti-coagulante. Cependant, nous avons montré que l'extrait aqueux de *Laminaria digitata*, par exemple, riche en fucose, était l'un des plus actifs en termes d'activité anti-coagulante alors qu'il présente un taux de sulfates

très faible (3,5%) par rapport à l'extrait aqueux d'*Himanthalia elongata*, également riche en fucose mais avec une quantité de sulfates bien plus élevée (12,8%) qui pourtant présente une activité anti-coagulante plus faible. De plus, deux extraits, présentant le même taux de sulfates comme celui d'*Himanthalia elongata*, riche en fucose, et *Ulva sp.*, riche en rhamnose n'ont pas la même activité anti-coagulante. Ces résultats confirment différentes publications, qui mettent en évidence **l'importance de la sulfatation pour l'activité anti-coagulante mais également la présence d'embranchements sur le squelette carboné, le motif de sulfatation et la composition monosaccharidique** (Nishino, Aizu, et Nagumo 1991b; Dobashi et al. 1989; Mourão 2004), **la masse moléculaire** (Nishino, Aizu, et Nagumo 1991b; Ciancia et al. 2007; Chandía et Matsuhiro 2008). Les acides uroniques ne sont pas nécessaires à l'activité anti-coagulante mais ils peuvent l'augmenter en améliorant la flexibilité de la chaîne du polysaccharide (Li et al. 2008).

Il ressort de cette étude que les extraits de *Laminaria digitata* et *Chondrus crispus* sont ceux ayant le **meilleur potentiel anticoagulant**. Malgré les faibles résultats d'activité anti-coagulante de l'extrait aqueux d'*Ulva sp.*, nous avons décidé pour la suite de l'étude de garder ces trois espèces d'algues brune, rouge et verte, et d'extraire et purifier les trois grandes classes de polysaccharides sulfatés présent dans ces macroalgues (fucoïdanes de *Laminaria digitata*, carraghénanes de *Chondrus crispus* et ulvanes d'*Ulva sp.*) par le procédé développé à SEPROSYS, en passant ainsi de l'échelle du laboratoire à l'échelle pilote.

Un procédé permettant l'obtention de polysaccharides sulfatés de pureté élevée

Le principe d'extraction des polysaccharides sulfatés de macroalgues développé par SEPROSYS, originellement développé pour la purification fractionnée des molécules d'algues vertes, permet d'obtenir des polysaccharides sulfatés présentant une **pureté élevée**. Les polysaccharides se trouvent sous forme de **sels de sodium** en sortie du procédé afin de mimer ce qui est commercialisé chez les dérivés d'héparines qui se trouvent sous forme de sels de sodium pour la grande majorité.

Le **rendement d'extraction** des ulvanes, qui est de **8-10%** par rapport à l'algue sèche dessalée, bien qu'assez faible, est compris dans la fourchette de données que l'on peut trouver dans la littérature. En effet, les rendements en ulvanes classiquement observés sont situés entre 1,2 et 27,5% par rapport au poids sec de l'algue (Alves, Sousa, et Reis 2013). En général, le procédé d'extraction et purification des ulvanes fait intervenir une étape d'extraction en milieu aqueux contenant parfois des agents chélatants cationiques (Ray et Lahaye 1995), des acides ou une solution de carbonate de sodium suivie d'une étape de précipitation dans un solvant organique, d'ordinaire de l'éthanol (Mao et al. 2006; Wang et al. 2013) ou de l'acétone (Guerra-Rivas et al. 2011).

Afin de pouvoir extraire les polysaccharides sulfatés de *Laminaria digitata*, une étape de **précipitation des alginates** a dû être ajoutée au procédé. L'extraction des fucoïdanes est

généralement réalisée en milieu acide en présence de cations divalents, car cela permet d'éviter la coextraction des alginates suivi d'une précipitation par éthanol (Ale, Mikkelsen, et Meyer 2011). La suite de l'extraction SEPROSYS[®] sur *Laminaria digitata* est identique à celle de ULVAN-01 et le polysaccharide sulfaté purifié est appelé LAMI-01. Tout comme ULVAN-01, LAMI-01 présente une pureté élevée, avec **moins de 5% de protéines contaminantes**.

Ainsi, le procédé SEPROSYS[®] permet de récupérer des polysaccharides sulfatés de haute pureté, ULVAN-01 et LAMI-01, qui présentent toutefois des masses moléculaires assez faibles comparées aux polysaccharides commerciaux d'ulvanes et de fucoïdanes extraits respectivement de *Ulva lactuca* et *Fucus vesiculosus*. En effet, ULVAN-01 a une masse moléculaire de 56 kDa, contre plus de 300 kDa pour l'ulvane commercial et LAMI-01 a une masse moléculaire de 45 kDa mais avec une très haute polydispersité et un grand nombre de polysaccharides de poids moléculaire plus faibles contre 62 kDa pour le fucoïdane commercial. Cette diminution de la masse moléculaire des polysaccharides sulfatés extraits par le procédé SEPROSYS[®] est probablement dûe à un **phénomène de dépolymérisation** des polysaccharides lors de l'étape d'échange d'ions, et, plus particulièrement lors du passage sur résine cationique. En effet, nous avons pu mesurer un pH acide, situé entre 1,8 et 2 en sortie de résine cationique. La solution de polysaccharides est ensuite chauffée 2 heures à 80°C afin de faire flocculer les protéines restantes, ce qui peut également avoir un impact sur le poids moléculaire des polysaccharides.

Une activité anti-coagulante des fucoïdanes et ulvanes influencée par la masse moléculaire

L'activité anti-coagulante de LAMI-01 et ULVAN-01, déterminée par coagulométrie est **plus faible que celle des extraits aqueux de *Laminaria digitata* et *Ulva sp.* ainsi que celle des polysaccharides commerciaux**. L'hypothèse principale pour expliquer ce manque d'activité des polysaccharides SEPROSYS[®] repose sur l'effet d'une diminution de l'activité anti-coagulante avec la **diminution de la masse moléculaire**. Ceci est en accord avec certaines études précédentes portant sur l'impact de la dépolymérisation sur des polysaccharides d'algues brunes et rouges. En effet, une étude sur des fucanes extraits d'*Ecklonia*, a montré **qu'à sulfatation équivalente**, l'activité anti-coagulante des polysaccharides décroît avec la diminution de leur masse moléculaire (Nishino, Aizu, et Nagumo 1991b). Les fucanes de masse moléculaire autour de 55 kDa sont plus actifs que ceux de 27 kDa et eux même le sont plus que ceux de 10 kDa. De même, des polysaccharides sulfatés de hauts poids moléculaires extraits de la macroalgue verte *Codium* ont montré une activité anti-coagulante plus importante que ceux de plus faibles poids moléculaires (Ciancia et al. 2007).

Ces résultats, observés sur des fucoïdanes ou des arabinanes sulfatés, ont été confirmés sur nos ulvanes. ULVAN-01 a été soumis à une dépolymérisation par résine

Résultats, partie A.4.

d'échange d'ions et nous avons mis en évidence que l'activité déjà assez faible du polysaccharide diminuait au cours de la dépolymérisation (figure 28).

Comme il a été montré précédemment, ULVAN-01 ne présente aucune activité sur la voie intrinsèque de la coagulation (test PT), même pour des concentrations supérieures à 5 mg.mL⁻¹. Au cours de la dépolymérisation, les différents prélèvements ne présentent pas plus d'activité. Bien qu'assez faible, ULVAN-01 présente une activité anti-coagulante sur la voie extrinsèque et/ou commune de la coagulation (test TCA). Sur cette voie de la coagulation, le temps de coagulation du plasma en présence 6,25 mg.mL⁻¹ de ULVAN-01 est de 73 secondes (témoin négatif à 38,2 secondes). Plus celui-ci est dépolymérisé, plus le temps de coagulation raccourcit, l'ulvane perd donc son activité (Figure 28) ; en effet, pour un DP moyen de 40, le temps de coagulation à la même concentration est de 68,2 secondes, 55,3 secondes pour le DP moyen de 20 puis 38 secondes pour l'ulvane avec un DP moyen de 5-6. Ce résultat est similaire pour l'activité anti-coagulante des ulvanes dépolymérisés sur la voie commune de la coagulation (test TT). En effet, plus le DP diminue, plus le temps de coagulation du plasma diminue, ce qui indique une perte d'activité anti-coagulante (Figure 28).

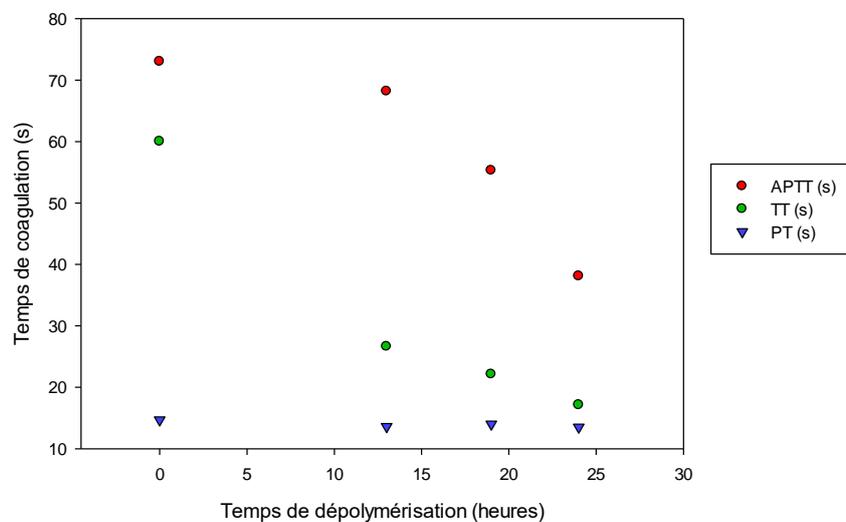


Figure 28 : Evolution de l'activité anti-coagulante mesurée par coagulométrie de ULVAN-01 au cours de sa dépolymérisation par résine d'échange d'ion

Ces résultats obtenus sur les différents ulvanes testés nous ont menés à nous poser des questions sur le manque d'activité anti-coagulante de ces polysaccharides. En effet, malgré le manque de littérature concernant l'activité anti-coagulante des ulvanes, une étude portant sur l'activité anti-coagulante d'ulvanes extraits d'*Ulva conglobata* démontre un fort potentiel de ces molécules comme anti-coagulants (Mao et al. 2006). Cependant, l'une des différences majeures entre ces ulvanes et ULVAN-01 est leur **forte teneur en sulfates**, entre 23 et 35%, contre 11% pour ULVAN-01.

Résultats, partie A.4.

Le procédé SEPROSYS[®] a été imaginé pour purifier des polysaccharides sulfatés de macroalgues par un procédé vert, ne faisant pas intervenir de solvant, mais qui nécessite dans notre travail des étapes de transformations afin de sulfater ces polysaccharides sulfatés dans le contexte de l'étude de l'activité anti-coagulante. La sulfatation peut aujourd'hui être réalisée par voie chimique ou enzymatique. La voie enzymatique implique à l'heure actuelle l'utilisation de sulfo-transférases recombinantes, ainsi que de leur donneur de groupement sulfo, le 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS). Les enzymes ainsi que le donneur étant peu disponibles et de coût très élevé, leur usage est réservé à des applications de synthèse de composés à très haute valeur ajoutée. Ajouté au fait que l'application de ce type de voie de synthèse au procédé SEPROSYS[®] était difficilement envisageable d'un point de vue technologique, ces deux éléments nous ont conduit à faire le choix d'augmenter la sulfatation de ULVAN-01 **par voie chimique**, selon une méthode couramment utilisée et applicable au procédé SEPROSYS[®]. Cette méthode fait intervenir le complexe sulfure trioxide-pyridine dans un solvant composé de DMF et pyridine. Après application de cette méthode de sulfatation chimique sur ULVAN-01, nous avons étudié l'impact de la sulfatation sur l'activité anti-coagulante de l'ulvane obtenu, nommé ULVAN-02.

L'étape de sulfatation est efficace, puisque les résultats concluent à un doublement de la quantité de sulfates sur le squelette carboné des ulvanes. En effet, le degré de sulfatation passe de **11% pour ULVAN-01 à 20% pour ULVAN-02**. De plus, le procédé de sulfatation augmente encore la pureté de l'ulvane obtenu, puisqu'il ne reste plus, à la fin, qu'une infime quantité de protéines contaminantes (<1%). Le procédé chimique de sulfatation, qui est assez simple, est extrapolable à grande échelle, si l'on imagine une industrialisation du procédé.

Une activité anti-coagulante de l'ulvane dépendante de sa sulfatation

Afin d'identifier la composition et l'enchaînement osidique de ULVAN-01 et ULVAN-02, une méthode d'analyse par chromatographie liquide ultra-haute pression couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-MS HR) a été utilisée. Il ressort de ces analyses deux résultats principaux :

- Premièrement, la structure caractéristique des ulvanes est retrouvée au-sein de l'extrait ULVAN-01 : il s'agit majoritairement d'un **enchaînement répété de disaccharides composés de rhamnose et d'acide uronique** (glucuronique ou iduronique), sulfatés ou non. Ceci confirme les résultats obtenus pour les dosages biochimiques d'ULVAN-01 où l'on observait une proportion élevée d'acides uroniques. Ce résultat est en accord avec des travaux précédents concernant la structure des ulvanes qui ont montré que l'unité disaccharidique répétée majoritaire des ulvanes est de type acide ulvanobiuronic 3-sulfate contenant soit de l'acide glucuronique, soit de l'acide iduronique de type $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1,4)-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow\text{)]}_n$ ou $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Idop-(1,4)-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow\text{)]}_n$ (Lahaye et Robic 2007).

Cet enchaînement peut toutefois parfois être interrompu par un **résidu glucose (ou galactose) ou xylose**. La présence de ces monosaccharides est peu fréquente (1/10 ou 1/11 au maximum)

mais logique compte-tenu de la composition osidique connue des ulvanes (Lahaye et Robic 2007). Par ailleurs, les résultats démontrent la possibilité de retrouver parfois deux acides uroniques (GlcA ou/et IdoA) enchaînés. De plus, nous avons pu mettre en évidence la présence d'un groupement sulfate pour trois résidus, majoritairement sur les rhamnoses, ce qui confirme les données de la littérature où les rhamnoses des ulvanes sont sulfatés en position 3, mais nous avons également mis en évidence la présence, même si minoritaire, de sulfates sur certains résidus d'acides uroniques.

- Deuxièmement, nous avons mis en évidence l'impact de la méthode de sulfatation chimique opérée sur ULVAN-01 pour obtenir ULVAN-02. Les 4 disaccharides obtenus démontrent en effet que les groupements sulfates après sulfatation peuvent être retrouvés **à la fois sur le rhamnose et sur l'acide uronique**, et ce jusqu'à deux groupements sulfates par résidu. Cette information confirme que la méthode de sulfatation chimique utilisée est **totale** **aléatoire** et permet de sulfater jusqu'à l'intégralité des 2 alcools libres du rhamnose ou de l'acide uronique (GlcA ou IdoA) au-sein de la structure polysaccharidique de l'ulvane. Considérant le taux de sulfates mesuré pour ULVAN-02, proche de 20% et impliquant donc en moyenne une fréquence moyenne de deux groupements sulfate pour trois résidus, cela signifie donc qu'il existe probablement au-sein de la structure polysaccharidique d'ULVAN-02, après sulfatation chimique, des zones faiblement voire très faiblement sulfatées et des zones hyper-sulfatées (Figure 29).

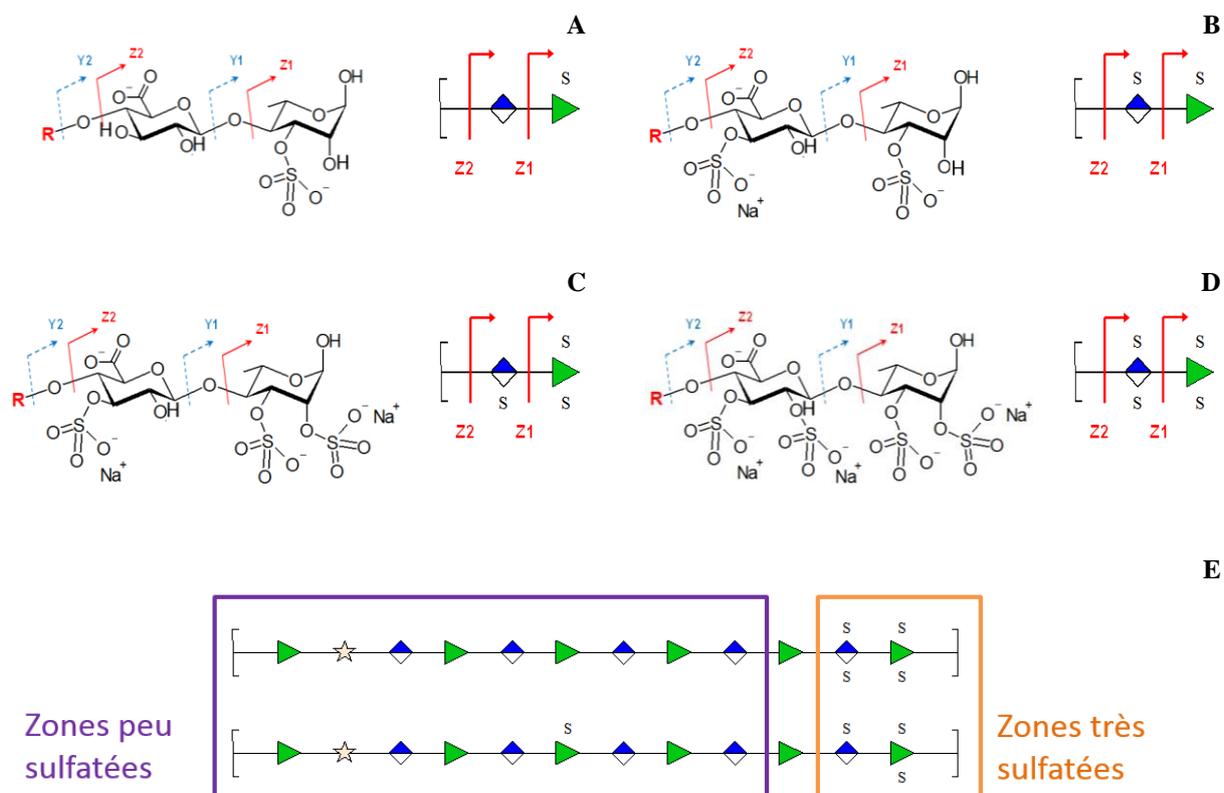


Figure 29 : Disaccharides d'ULVAN-02 identifiés par UHPLC-MS/MS sulfatés une fois (A), deux fois (B), trois fois (C) ou quatre fois (D) et exemple d'enchaînement oligosaccharidiques présents dans ULVAN-02 (E).

Résultats, partie A.4.

L'intérêt de cette sous-partie était d'étudier l'impact du degré de sulfatation d'ulvanes extraits d'*Ulva sp.* sur leur activité anticoagulante. Plusieurs études ont démontré précédemment que l'activité anticoagulante des polysaccharides de macroalgues brunes et rouges était largement affectée par le degré de sulfatation. Cependant, d'autres facteurs, tels que la composition osidique, la masse moléculaire (Nishino, Aizu, et Nagumo 1991b) et la position des groupements sulfates (Pereira, Mulloy, et Mourão 1999; Melo et al. 2004) sont des caractéristiques importantes pouvant influencer sur l'activité biologique de ces polysaccharides. La plupart de ces observations ont été faites à partir de polysaccharides sulfatés de macroalgues brunes ; jusqu'ici, seules quelques études concluent quant au potentiel de certains ulvanes comme agents anticoagulants sans que l'on sache ce qui influence ou est à l'origine de cette activité.

Le premier point qui ressort de cette étude est la **très faible activité d'ULVAN-01**, sulfaté à la hauteur de 11%, quelle que soit la cible étudiée. En effet, ULVAN-01 ne présente aucune activité sur les deux enzymes de la coagulation : les facteurs Xa et IIa, et ce en présence et en absence d'antithrombine. Si l'on observe son activité sur une échelle plus large, l'ulvane n'a aucune activité sur la voie extrinsèque de la coagulation (test PT). La seule activité observée pour cet extrait polysaccharidique se situe au niveau des voies intrinsèque et commune de la coagulation *in vitro* (tests aPTT et TT). Néanmoins, il est important de noter que l'activité sur ces deux voies est très faible par rapport à celles de l'héparine NF et du Lovenox®.

Cependant, une étude de Mao et al sur des ulvanes extraits d'*Ulva conglobata* présente des résultats prometteurs en termes d'activité anticoagulante (Mao et al. 2006). En effet, les 3 polysaccharides extraits de cette macroalgue montrent une activité sur la voie intrinsèque et/ou commune de la coagulation (test aPTT) avec un temps de coagulation de 120 secondes pour des concentrations autour de 2,5 µg.mL⁻¹ pour SP-1, 4 µg.mL⁻¹ pour SP-2 et 5 µg.mL⁻¹ pour SP-3 contre plus de 1000 µg.mL⁻¹ pour ULVAN-01. Or, une des différences majeures entre ces ulvanes et ULVAN-01 est leur sulfatation, avec 35% de sulfates pour SP-1, 23% pour SP-2 et 28% pour SP-3 contre 10% pour ULVAN-01. Après la sulfatation chimique, ULVAN-02 présente un degré de sulfatation de 20% donc très proche de celui de l'extrait SP-2 de l'étude de Mao et al. La concentration nécessaire de ULVAN-02 afin d'atteindre un temps de coagulation de 120 s est quasi identique à celui de SP-2, autour de 4 µg.mL⁻¹.

Sur la voie commune, ULVAN-01 présente une certaine activité, mais qui est faible en comparaison de celle observée pour ULVAN-02. En effet, la concentration nécessaire en extraits pour doubler le temps de coagulation du témoin négatif est de 40 µg.mL⁻¹ pour ULVAN-01 contre 2,62 µg.mL⁻¹ pour ULVAN-02. L'héparine NF est la plus active sur cette voie, avec une concentration de 0,45 µg.mL⁻¹, suivi par le Lovenox®, un peu plus actif qu'ULVAN-02 avec une concentration de 1,82 µg.mL⁻¹ (tableau X).

Le résultat le plus marquant de ces tests de coagulométrie concerne l'activité d'ULVAN-02 **sur la voie extrinsèque de la coagulation** (test PT). En effet, la très grande

majorité des études réalisées sur l'activité anticoagulante des polysaccharides sulfatés de macroalgues vertes sur la voie extrinsèque de la coagulation, que ce soient sur les arabinanes sulfatés des espèces *Codium fragile* (Ciancia et al. 2007), *Codium vermilara* (Ciancia et al. 2007), *Codium dwarkense* (Siddhanta et al. 1999; Shanmugam, Mody, et Siddhanta 2001) ou encore *Enteromorpha clathrata* (Qi et al. 2012), les galactanes sulfatés extraits de *Codium cylindricum* (Matsubara et al. 2001) ou *Codium divaricatum* (Li et al. 2015) ou les rhamnanes sulfatés extraits de *Monostroma latissimum* (Zhang et al. 2008) ou *Monostroma nitidium* (Mao et al. 2008), ou les ulvanes de type glucuronorhamnoxylanes de *Capsosiphon fulvescens* (Synytsya et al. 2015) concluent quant à l'**absence d'activité sur la voie extrinsèque de la coagulation, au contraire des voies intrinsèque et commune de la coagulation**. Les résultats obtenus pour le test PT sur l'extrait ULVAN-01 sont en accord avec ces observations puisque celui-ci est inactif sur cette voie de la coagulation. **Au contraire, l'activité d'ULVAN-02 sur ce test est intéressante puisqu'il y est 100 fois plus actif que le Lovenox®.**

Nous pouvons donc conclure que la sulfatation d'ULVAN-01 permet d'augmenter l'activité anticoagulante de cet ulvane sur les trois voies de la coagulation *in vitro*, mais également sur l'activité ciblée anti-Xa et anti-IIa antithrombine-dépendante.

En effet, pour l'activité anti-IIa antithrombine-dépendante de ULVAN-02, la concentration nécessaire afin d'atteindre 50% d'activité résiduelle de l'enzyme est de 18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ alors que ULVAN-01 est inactif. Cependant, il est important de remarquer que cette concentration est élevée par rapport aux résultats obtenus pour les extraits d'*Ulva conglobata*, pour lesquels la concentration est d'environ 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour SP-2. De plus, elle est très élevée par rapport à l'activité de l'héparine NF et encore plus du Lovenox® (tableau X). Pour finir, les polysaccharides d'*Ulva conglobata* sont actifs sur l'activité anti-IIa directe (sans antithrombine), ce qui n'est pas le cas pour nos extraits ULVAN-01 et ULVAN-02.

Tableau X : Activité anti-coagulante de ULVAN-01 et ULVAN-02 (résultats publication A.3.2)

	Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	UFH	Lovenox®	ULVAN-01	ULVAN-02
APTT ^(a)	0.75	4.7	500	2.4
PT ^(a)	14.25	480	inactif	45
TT ^(a)	0.45	1.82	40	2.62
anti-Xa ^(b)	0.2	0.125	inactif	17.5
anti-IIa ^(b)	0.25	1.75	inactif	18

^(a) Concentration en extrait permettant de doubler le temps de coagulation du témoin négatif (NaCl 0.9%)

^(b) Concentration en extrait inhibant 50% de l'activité résiduelle des facteurs de la coagulation (IC_{50})

ULVAN-01 ne présente pas d'activité anti-Xa antithrombine dépendante alors qu'ULVAN-02 est actif, avec une concentration pour obtenir 50% d'activité résiduelle de

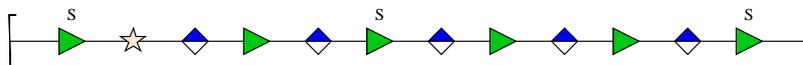
l'enzyme Xa de $17,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, cependant autour de 100 fois plus élevée que pour l'héparine NF et le Lovenox[®]. Au contraire des observations qui ont pu être faites sur l'activité anti-IIa, c'est cette fois notre extrait ULVAN-02 qui présente une activité anti-Xa supérieure à celle des extraits d'*Ulva conglobata*, qui ne présentent pas d'activité sur cette cible là (données non présentées). Cette observation est également partagée par d'autres études travaillant sur des rhamnanes sulfatés extraits de *Monostroma nitidum* (Maeda et al. 1991) ou *Arthrospira platensis* (Majdoub et al. 2009) qui ne présentent aucune activité anti-Xa.

Une activité des ulvanes dépendantes de différents facteurs structuraux

Ces différences de cibles au niveau de l'activité anti-coagulante d'ulvanes présentant pourtant des compositions biochimiques assez proches (en termes de % de rhamnoses, et surtout de sulfates) confirment bien que, même si le degré de sulfatation est primordial dans l'activité anti-coagulante de ces polysaccharides sulfatés, **d'autres facteurs interviennent pouvant modifier l'ampleur de leurs capacités anti-coagulantes, mais également les cibles de ces activités.**

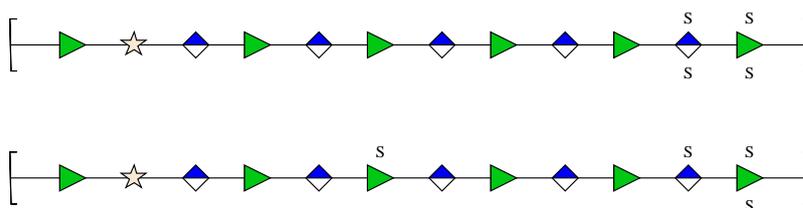
Nous avons montré auparavant que la **masse moléculaire** des ulvanes avait un rôle important sur leur activité anti-coagulante. Ainsi, **la masse moléculaire** de l'ulvane est également, **en plus du degré de sulfatation**, un **facteur essentiel pour son activité anti-coagulante.**

A



Exemple d'un motif de sulfatation naturel d'un ulvane

B



Exemples de motifs de sulfatation obtenus après sulfatation chimique d'ULVAN-01

Figure 30 : Représentation symbolique de fragments oligosaccharidiques identifiés pour un ulvane sulfaté à la hauteur de 20%, naturel (A) et sulfaté par sulfatation chimique (B)

En plus de la composition osidique, du degré de sulfatation et de la masse moléculaire, **la position des groupements sulfates** apparaît comme ayant un rôle important sur l'activité anti-coagulante des ulvanes.

Pour le test PT, par exemple, l'ulvane extrait de *Capsosiphon fulvscens* et sulfaté à 15,4% (Synytsya et al. 2015), les rhamnanes sulfatés extraits de *Monostroma latissima* et sulfatés entre 21 et 26% (Zhang et al. 2008; Mao et al. 2009; Li et al. 2011) ou de *Monostrom nitidium* sulfatés à 28,2 et 34,4% (Mao et al. 2008) ne présentent aucune activité sur la voie extrinsèque, malgré des degrés de sulfatations proches de celui de ULVAN-02. **Cela confirme que la teneur en sulfates n'est pas le seul facteur à l'origine de l'activité anti-coagulante des ulvanes.** De ces résultats, nous pouvons conclure tout d'abord que la composition osidique joue très probablement un rôle. Une autre hypothèse que nous pouvons faire afin d'expliquer ces différences d'activité concerne **la position des groupements sulfates**. Lors du procédé de sulfatation chimique au complexe sulfure-trioxyde pyridine, les sulfates peuvent se positionner sur d'autres carbones que le carbone habituellement sulfaté des ulvanes (c'est-à-dire le carbone 3 du rhamnose). Nous avons en effet montré, lors des analyses en UHPLC-MS HR que la méthode de sulfatation chimique utilisée pour obtenir ULVAN-02 permettait d'obtenir des ulvanes avec une **sulfatation très aléatoire**, présentant des zones très sulfatés et d'autres moins. Ainsi, la position des sulfates entre les ulvanes natifs et ULVAN-02 sont différentes (Figure 30), ce qui pourrait être l'une des causes de ces activités différentes malgré un degré de sulfatation équivalent. Ceci confirmerait des observations déjà effectuées chez d'autres types de polysaccharides sulfatés comme les fucoïdanes où la position des groupements sulfates sur le polysaccharide est un facteur majeur pour son activité anti-coagulante (Pereira, Mulloy, et Mourão 1999; Melo et al. 2004).

Conclusion:

- Les extraits aqueux sont globalement **plus actifs sur la voie intrinsèque** de la coagulation (test aPTT). La plupart des extraits démontrent une activité intéressante sur cette voie, avec un facteur de concentration de seulement 5 entre l'activité du Lovenox[®] et celle des extraits aqueux de *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* ou *Chondrus crispus*
- L'activité anti-Xa et anti-IIa observée sur les extraits est **antithrombine dépendante**. Aucun extrait n'est capable d'inhiber l'activité de ces deux enzymes centrales de la cascade en absence de l'inhibiteur naturel de la coagulation.
- ***Laminaria digitata* (fucoïdanes) et *Chondrus crispus* (carraghénanes)** sont les deux algues les plus intéressantes en termes d'activité anti-coagulante et seront conservées pour la suite de l'étude. L'intérêt particulier de l'entreprise pour les ulves et l'originalité des ulvanes nous font conserver également l'*Ulva sp.*

- Le procédé développé par la société est **adapté pour l'extraction des ulvanes** de macroalgues vertes. Pour l'extraction des fucoïdanes, une étape de **précipitation des alginates** doit être ajoutée. Les carraghénanes de la macroalgue *Chondrus crispus* sont trop visqueux, le procédé n'est pas adapté à leur purification.
- L'activité anti-coagulante d'ULVAN-01 et LAMI-01 est **inférieure** à celle des extraits aqueux et des polysaccharides commerciaux.
- L'hypothèse la plus probable est la **diminution de l'activité** des extraits SEPROSYS[®] **avec celle de leur masse moléculaire**. En effet, le procédé dépolymérise les polysaccharides sulfatés.

- Le procédé développé par SEPROSYS permet d'obtenir des ulvanes sous forme de sels de sodium d'une **pureté élevée** (autour de 87% avec seulement 4% de protéines contaminantes) sans utilisation de solvants ou acides. Le rendement entre **8 et 10%** se situe dans la fourchette de ce que l'on trouve dans la littérature mais pourrait être amélioré.
- Le procédé de sulfatation est efficace car il permet de **doubler** le degré de sulfatation de l'ulvane natif. L'ulvane obtenu présente une **grande pureté** (moins de 1% de protéines contaminantes).
- L'augmentation de la sulfatation est à l'origine d'une forte augmentation de l'activité anti-coagulante et agit en particulier sur le **début de la cascade de la coagulation** (voie extrinsèque et intrinsèque)
- Comme pour d'autres polysaccharides sulfatés, d'autres facteurs tels que **la composition osidique, la position des sulfates et la masse moléculaire** influencent l'activité anti-coagulante des ulvanes, **modifiant leur efficacité ainsi que leurs cibles dans la cascade**.

PARTIE B : Evaluation de l'activité dermo-
cosmétique anti-âge d'extraits de macroalgues

B.1. Introduction générale

Ces dernières années, la méfiance des consommateurs envers les formulations cosmétiques conventionnelles a augmenté. Même si les cosmétiques naturels sont encore assez minoritaires sur le marché, l'industrie cosmétique se tourne de plus en plus vers des compositions contenant des produits naturels (Wang et al. 2015). Dans cette optique, l'environnement marin représente une formidable source encore largement sous-exploitée de nouveaux constituants, grâce à leur diversité biologique mais aussi chimique. La recherche concernant les molécules d'origine marine pour leurs intérêt dans le domaine de la cosmétique comme les terpénoides, les pigments, les polysaccharides, les acides aminés de type mycosporine (MAA), les protéines et peptides, les acides gras insaturés, le tocophérol, les composés phénoliques... (Agatonovic-Kustrin et Morton 2013)

Aujourd'hui, 80% du marché des cosmétiques cutanés sont en fait dévoués aux cosméceutiques. Les cosméceutiques destinés aux traitements de la peau représentent un marché d'environ 10 milliards de dollars en 2015 (projection groupe Freedonia). Cette contraction entre « cosmétique » et « pharmaceutique » concerne des produits contenant des ingrédients pouvant agir sur les fonctions biologiques de la peau comme des vitamines, enzymes, antioxydants, peptides... (Kligman 2000)

Pour ce qui est des cosméceutiques marins, ceux-ci contiennent généralement des composants d'algues, de bactéries marines, de poissons, de coraux, de crustacés, de sels marins ou même d'eau de mer. Le plus gros marché de cosméceutiques à base d'algues du monde est la France avec environ 5000 tonnes d'algues (humides) destinées à ce marché en 2006. La très grande majorité des algues utilisées sont des macroalgues brunes et rouges.

Aujourd'hui, les composants d'origine marine sont utilisés dans les cosméceutiques pour leurs différentes propriétés, comme additifs (par exemple comme émulsifiants, surfactants, gélifiants, colorants...) ou directement comme agents actifs. Les activités biologiques dermo-cosmétique des composés extraits de macroalgues peuvent être très diverses comme la photo-protection, l'activité anti-oxydante, la dépigmentation ou blanchiment, l'activité anti-inflammatoire, anti-âge, hydratante, anti-microbienne (Thomas et Kim 2013; Bedoux et al. 2014)... Dans ce travail, l'activité ciblée concerne l'activité anti-âge et, plus particulièrement, l'activité anti-ride ou de régénération de la peau.

Il a été montré qu'au cours du vieillissement, il existe des modifications structurales et fonctionnelles du derme. Ces modifications résultent de mécanismes complexes qui associent une diminution de la synthèse d'acide hyaluronique, de protéoglycannes (Carrino, Sorrell, et Caplan 2000), de collagènes de type I et III (Varani et al. 2006) et une altération de l'élastine (Uitto 1979). L'augmentation de l'activité des protéases et, en particulier, l'activité des MMP est particulièrement décrite (Fligiel et al. 2003). Les conséquences de ces processus sont nombreuses : augmentation de la rigidité du réseau de collagène, diminution du volume matriciel, le tout retentissant sur les propriétés biomécaniques du derme à l'origine de la formation des rides (Fisher et al. 2009).

Il y a donc une réelle demande des consommateurs pour des produits dermo-cosmétiques contenant des composés ou extraits naturels capables de contrer cette dégradation et diminution de la quantité des composés de la MEC comme le collagène ou l'acide hyaluronique.

Cette partie B sera constituée de deux sous-chapitres ;

- Dans la première sous-partie, nous évaluerons le potentiel d'une dizaine d'extraits aqueux de macroalgues pour leur capacité à activer la biosynthèse de collagène par des fibroblastes dermiques humains. Les macroalgues testées feront partie des trois grandes classes : *Himanthalia elongata*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Saccharina latissima*, *Undaria pinnatifida* pour les macroalgues brunes, *Chondrus crispus* pour les macroalgues rouges et *Ulva intestinalis* et *Ulva sp.* pour les macroalgues vertes. La deuxième partie de cette étude consistera à identifier la ou les fractions responsables de l'activité observée. Pour cela, nous effectuerons deux précipitations successives sur les extraits aqueux présentant des activités intéressantes afin de récupérer une fraction « protéique » (précipitation au sulfate d'ammonium) et une fraction « polysaccharidique » (précipitation à l'éthanol) puis évaluerons leur activité sur la production de collagène par les fibroblastes. Cette étude fait l'objet d'un article qui sera soumis prochainement.



Figure 31 : Espèces de macroalgues étudiées dans la partie B.1.

- Dans la deuxième sous-partie, également construite sous forme d'un article à soumettre, nous évaluerons l'effet des ulvanes extraits d'*Ulva sp.* originaire de l'île d'Oléron sur la production de collagène et d'acide hyaluronique *in vitro* par des fibroblastes dermiques humains normaux. Pour cela, les macroalgues vertes seront soumises au procédé d'extraction et de purification développé par SEPROSYS afin

Résultats, partie B.1.

d'obtenir des ulvanes de pureté élevée. Les polysaccharides seront testés bruts, c'est-à-dire en sortie de procédé, ainsi qu'après dépolymérisation sur une résine d'échange d'ions. L'effet des ulvanes de différents poids moléculaires sur la biosynthèse d'acide hyaluronique par les fibroblastes dermiques sera comparé à celui d'un stimulant classique, le TGF- β (Transforming Growth Factor Beta).

B.2. Effet stimulant d'extraits aqueux de macroalgues sur la production de collagène in vitro par des fibroblastes dermiques humain

Résumé

Des extraits aqueux de différentes macroalgues ont été préparés et testés pour leur capacité à stimuler la production de collagène par des fibroblastes dermiques humains afin de pouvoir être utilisés comme ingrédients dans des produits de dermo-cosmétique anti-âge. Les macroalgues testées appartiennent aux trois grandes catégories de macroalgues : *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Himantalia elongata*, *Laminaria digitata*, *Saccharina latissima* et *Undaria pinnatifida* pour les macroalgues brune, *Chondrus crispus* pour les macroalgues rouges et *Ulva sp.* ainsi qu'*Ulva intestinalis* pour les macroalgues vertes. Trois de ces extraits ont montré des résultats particulièrement intéressants en termes de production de collagène : les extraits aqueux de *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum* et *Ulva intestinalis*. Ces trois algues ont donc été conservées pour la suite de l'étude. Dans la seconde partie de ce travail, les deux fractions majeures de ces extraits aqueux ont été séparées par précipitation, avec, tout d'abord, une précipitation au sulfate d'ammonium afin de récupérer une fraction riche en protéines appelée fraction PR suivie d'une précipitation éthanolique afin de récupérer une fraction riche en polysaccharides nommée fraction PS. Cette étape avait pour objectif de déterminer l'origine de l'activité observée pour les cellules traitées avec les extraits aqueux complexes de ces trois algues.

Dans cette étude, nous avons montré que, pour les trois algues, l'activité observée sur la production de collagène par les fibroblastes était due à la fraction PR et que c'est l'algue *Ascophyllum nodosum* qui présentait l'activité la plus intéressante. De plus, nous avons montré que la stimulation de la production de collagène était due à une augmentation de la production individuelle des fibroblastes plutôt qu'à une stimulation de la croissance cellulaire.

Ces résultats font l'objet d'un article qui sera soumis très prochainement.

Stimulatory effects of macroalgae extracts on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts *in vitro*

Amandine Adrien^{1,2}, Justine Retailleau¹, Delphine Dufour², Stanislas Baudouin², Thierry Maugard¹, Nicolas Bridiau^{1*}

¹ Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSS, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

² SEPROSYS, Séparations, Procédés, Systèmes, 12 Rue Marie-Aline Dusseau, 17000 Rochelle, France.

*Author for correspondance (Address: Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSS, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. Fax: +33 546458277; E-mail: nicolas.bridiau@univ-lr.fr)

Abstract

Aqueous extracts from different macroalgae were prepared and tested for their ability to stimulate collagen production in normal human dermal fibroblasts so that they could be used in skincare as anti-aging compounds. The tested macroalgae belonged to the three groups of seaweeds: brown macroalgae (*Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Himanthalia elongata*, *Laminaria digitata*, *Saccharina latissima* and *Undaria pinnatifida*), red macroalgae (*Chondrus crispus*) and green macroalgae (*Ulva sp.* and *Ulva intestinalis*). Three of these extracts led to particularly interesting results in terms of collagen production: the aqueous extracts from *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Ulva intestinalis*. In the second phase of this work, we separated the two major fractions of the three interesting aqueous extracts: the “protein fraction” by ammonium sulfate precipitation, followed by ethanol precipitation to recover the “polysaccharide fraction” to identify the compounds responsible for the increase in collagen production. We showed that the “protein fraction” was the source of increased collagen production and the precipitated fraction of *Ascophyllum nodosum* had the highest activity. Furthermore, we demonstrated that the collagen production was due to an increase in collagen content per cell and not to the stimulation of dermal fibroblast growth.

Key words: seaweeds, human dermal fibroblasts, collagen, skincare

1. Introduction

Cosmetics, and in particular antiaging products, are a fast-growing market with a continuous research for identifying new active molecules. Consumer mistrust towards chemical ingredients increases the need for natural ingredients, especially those derived from traditional marine sources. The wide diversity of seaweeds and their large range of biochemical compounds make them interesting candidates for identifying and extracting biologically active substances with potential cosmetic use. Different bioactive substances extracted from macroalgae have been studied for their properties, including skin health protection and skin whitening, moisturizing, photoprotection, antioxidant and antiaging care (Thomas et Kim 2013; Bedoux et al. 2014).

Skin aging is divided into intrinsic aging, a natural process determined by different factors such as genetic factors, and extrinsic aging, which is due to external factors, mainly including photoaging due to sun exposure but also pollution and smoking. In the academic and patent literature, several publications have highlighted the potential antiaging properties of sulfated polysaccharides, peptides, fatty acids, pigments, terpenoids, and phlorotannins (Agatonovic-Kustrin et Morton 2013).

Skin aging has numerous consequences on skin histology. One of its major consequences is the decrease in collagen production and its alteration. Collagen, a protein family synthesized by fibroblasts, is the major component of the dermis. These structural changes in collagen could be one of the major causes of cutaneous clinical changes due to aging such as wrinkling (Varani et al. 2006).

In this study, ten species of seaweeds were investigated for their potential stimulatory effect on collagen production in normal human dermal fibroblasts (NHDF): *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Himanthalia elongata*, *Undaria pinnatifida*, *Saccharina latissima* for the brown macroalgae, *Chondrus crispus* for the red macroalgae, *Ulva sp.* and *Ulva intestinalis* for the green seaweeds. In the first part of this work, the seaweeds underwent an aqueous extraction and then, they were all tested for their ability to induce collagen production. Three of them showed very promising results and were further investigated: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Ulva intestinalis*. In the second part of this work, two fractions, a protein-rich fraction and a polysaccharide-rich fraction, were obtained from precipitation from the three seaweed aqueous extracts to identify what fraction(s) was responsible for the activities on collagen production.

2. Material and methods

2.1. Seaweed extract preparation and analyzes

2.1.1. Algal material

Ten seaweed species, including four brown macroalgae (*Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Himantalia elongata*, *Laminaria digitata*, *Saccharina latissima* and *Undaria pinnatifida*), one red macroalga (*Chondrus crispus*), and two green algae (French *Ulva sp.*, *Ulva intestinalis*, purchased from Aleor, France). *Ulva sp.* was purchased as flakes at a density of 0.5/2 mm, and the other seaweed samples were purchased as algal meal.

2.2.2. Aqueous extraction

Twenty-five grams of each algal powder were suspended in 1 L of water and were incubated at 80°C for 2h under continuous stirring at 800 rpm. The mixtures were roughly filtered to remove most algal residues and centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes at 20°C. The supernatants were concentrated by freeze-drying them, redissolved in water at the concentration of 10 mg/mL, and dialyzed on cellulose membrane tubing (molecular weight cut-off, 1,000 Da) against water, at 4°C for 3 days. The extracts were then freeze-dried and stored at 4°C until further analysis.

2.2.3. Protein fraction precipitation

To recover the protein fractions from the aqueous extracts, ammonium sulfate precipitation was performed. Thirty grams of aqueous extracts from *Ascophyllum nodosum*, *Ulva intestinalis* and *Fucus vesiculosus* were dissolved in 500 mL of phosphate buffer (20 mM, pH 7) under constant stirring for 24h at 4°C. The solutions were then centrifuged at 4,000 g for 45 minutes at 4°C. The supernatants were retained and the pellets were resuspended in 500 mL of phosphate buffer to repeat the process. After centrifugation, the supernatants were pooled and brought to 80% ammonium sulphate saturation. The solutions were stirred at 4°C overnight and then centrifuged at 4,000 g, 4°C for 60 minutes. The supernatants were removed and used for polysaccharide precipitation and the pellets were finally dissolved in 60 mL of distilled water. After a 72h dialysis (cut-off 1,000 Da), the retentate was lyophilized and stored at 4°C until further analysis.

2.2.4. Polysaccharide precipitation

Polysaccharides extracted from the aqueous extracts were precipitated from the supernatants of the protein precipitation. 40 mL of absolute ethanol were added to 10 mL of supernatant and the mixture was stirred at 4°C for 2h. The solution was then centrifuged at 10,000 g, 4°C for 5 minutes. The pellet was finally dissolved in 60 mL of distilled water and dialyzed for

72h at 4°C (cut-off 1,000 Da). After freeze-drying, the polysaccharides were kept at 4°C until further analysis.

2.2.5. Composition analysis

Neutral sugar content was determined according to the phenol-sulfuric method (Dubois et al. 1951) using anhydrous D-glucose as a standard. The uronic acid content was determined using the modified m-hydroxy-diphenyl-sulfuric acid method described by Filisetti-Cozzi et al (Filisetti-Cozzi et Carpita 1991) with D-glucuronic acid used as a standard. The protein content was determined using the bicinchoninic acid assay (Smith et al. 1985) with bovine serum albumin used as a standard. The sulfate content was obtained using the method by Jaques et al. using 3-amino-7-(dimethylamino)phenothiazin-5-ium chloride (Azure A), which binds sulfated groups in a polysaccharide chain (Jaques et al. 1968; Gao et al. 2003). The quantitation method of polyphenols was adapted from the original one (Singleton et Rossi 1965), using gallic acid as a standard: briefly, 50 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 200 µL of 20% sodium carbonate were successively added to 100 µL of sample and the mixture was incubated in the dark for 45 min at room temperature, prior to absorbance reading at 730 nm. The ash content was quantified by measuring sample mass loss after 15h of heating at 550°C.

2.2. Cell culture methods

NHDF were obtained from ATCC, Product Code CCD-1059Sk (ATCC® CRL-2072™), Lot number 62062292 from the skin of a 20-year old woman, according to the provider's information. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAN Biotech, Dutscher) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (PAN Biotech, Dutscher) and 1% of antibiotics: penicillin/streptomycin 10,000 U/10 mg/mL (v/v) (PAN Biotech, Dutscher) used as the complete culture medium. The cells were cultivated in a temperature-controlled, humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. The cells were grown in 75 cm² surface ventilated culture flasks (BD Falcon) and subcultured by trypsinization (0.05% trypsin, PAN Biotech). The culture medium was changed every 2-3 days. Cells were used between the 3rd and 8th passages for the experiments.

2.2.1. Cell proliferation

The MTT test was used according to the method described by Mosmann. It is a colorimetric assay allowing to assess cell proliferation, based on the reduction of tetrazolium salt (MTT) by living cells. The MTT, or (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) is a yellow salt. In the presence of mitochondrial succinate dehydrogenase found in active living cells, the tetrazolium ring of MTT is reduced and forms a violet product: formazan. The yellow solution becomes purple and the intensity of the purple coloration is proportional to the number of living cells.

Briefly, 100 µL of complete culture medium containing cells at 5x10⁴ cells/mL were seeded in 96-well plates (BD Falcon) and incubated for 24h. The medium was then removed and 100 µL of samples prepared in DMEM containing 1% of antibiotics or negative control (DMEM

containing 1% of antibiotics without extract sample) were added into the wells. After 48h, 25 μL of MTT (5% in PBS) were added into each well and the plates were incubated for 4h at 37°C. The medium was then removed and 200 μL of dimethyl sulfoxide were added into each well prior to incubation for 10 minutes and reading of absorbance at 550 nm using a Fluostar Omega microplate reader.

2.2.2. Analysis of collagen production

NHDF were seeded at a density of 5×10^4 cells/well into 24-well culture plates in complete culture medium. After 24h, the medium was removed and 1 mL of samples or negative control in DMEM containing 1% of antibiotics was added into each well. Plates were incubated for 48h at 37°C. The collagen production was then measured using the Sirius red staining procedure. Briefly, the medium was removed and cells were washed twice with PBS then fixed for 1h with 1 mL of Bouin's solution at room temperature. Following fixation, the Bouin's solution was then removed and cells were washed twice with distilled water. Cells were stained with 1 mL of Sirius red solution (0.5 g of Sirius Red 80 in 500 mL of saturated aqueous solution of picric acid) for 1h under shaking at room temperature. Samples were then washed successively with distilled water and 0.01 N HCl to remove unbound dye. The bound dye was finally solubilized in 500 μL of 0.1N NaOH for 1h under shaking and absorbance was read at 550 nm using a Fluostar Omega microplate reader.

3. Results

3.1. Biochemical composition of aqueous extracts

Prior to assess the effect of the ten seaweed aqueous extracts on NHDF proliferation and their collagen biosynthesis, we analyzed their biochemical composition (table 1).

Table 1. Chemical composition of seaweed aqueous extracts (dw%)

Seaweed extract	Ash (%)	Protein content (%)	Neutral sugar content (%)	Uronic acid content (%)	Sulfates on the sugar backbone (%)	Polyphenols (%)
<i>Ulva lactuca</i>	21.3	2.9	25.5	8.9	12.9	3.4
<i>Ulva intestinalis</i>	12.3	9.4	30.8	7.6	11.1	Nd*
<i>Fucus vesiculosus</i>	9.6	51.3	19.9	7.9	7.9	5.1
<i>Ascophyllum nodosum</i>	8.3	39.5	24.1	9.2	6.1	7.5
<i>Himantalia elongata</i>	14.1	13.7	16	19.4	12.8	4.8
<i>Saccharina latissima</i>	6.5	24.2	36.0	16.2	9.5	0.2
<i>Laminaria digitata</i>	7.3	8	21	14.1	3.5	11.9
<i>Undaria pinnatifida</i>	14.6	21.7	7.6	22.4	16.7	0.2
<i>Chondrus crispus</i>	13.5	14.4	19.2	2.3	9.4	1.4

*Nd: not detected

Résultats, partie B.2.

The aqueous extraction process generated seaweed extracts containing 16-34.8% of total neutral sugars. The protein content varied widely from one sample to another. *Ulva lactuca* extracts had the lowest protein content, 2.8 and 2.9%, while *Ascophyllum nodosum* extract had by far the highest protein content, reaching 57%. The protein content of *Fucus vesiculosus* extract was also high, with 37%. Furthermore, the uronic acid content of the extracts varied from 2.3 to 22.4%, with the highest value for *Himanthalia* and *Undaria* extracts, 19.4 and 22.4%, respectively, followed by the extracts from *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata* with an uronic acid content of about 15%. The proportion of sulfate groups on the sugar backbone was relatively low overall, and particularly for the *Laminaria digitata* extract, which had the lowest degree of sulfation (3.5%). In contrast, *Undaria pinnatifida*, *Ulva lactuca* and *Himanthalia elongata* had the highest degrees of sulfation (16.7%, 12.9% and 12.8%, respectively).

3.2. Effect of aqueous extracts on cell proliferation

To assess the impact of each aqueous extract on NHDF proliferation, a MTT test was performed after 48h of incubation with the extracts (Figure 1). The results are expressed as a percentage of viability compared to the negative control.

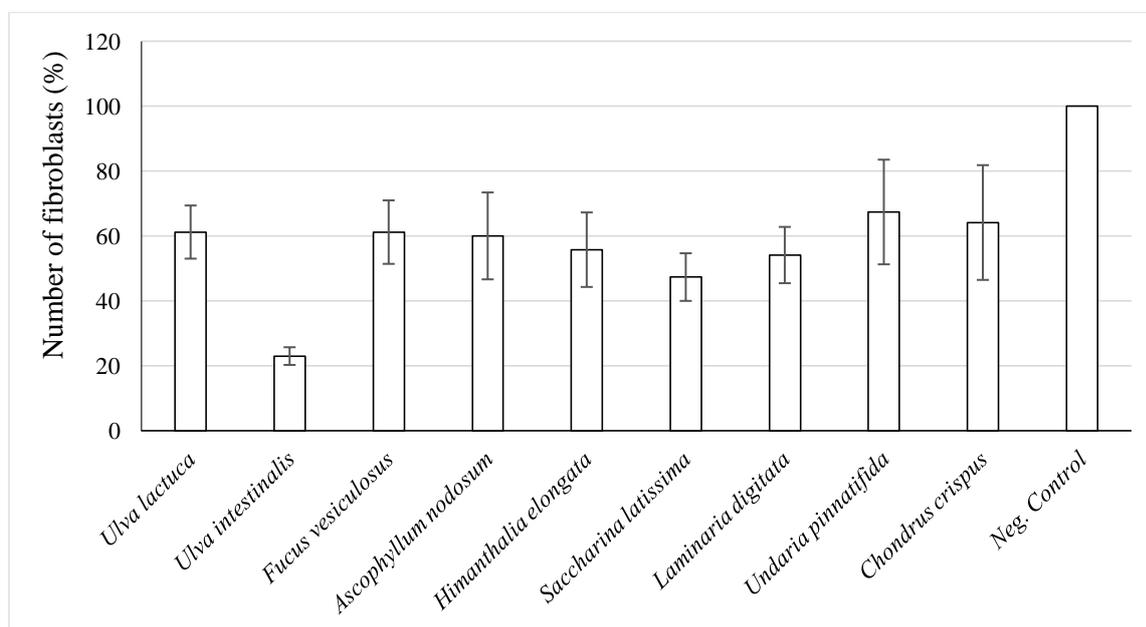


Figure 1. Effect of 1 mg.mL^{-1} of aqueous extracts on fibroblast proliferation in vitro. Human dermal fibroblasts were incubated with the samples for 48h. The MTT assay was then performed. The negative control was DMEM containing 1% of antibiotics.

All aqueous extracts had a negative impact on cell proliferation at the concentration of 1 mg.mL^{-1} (Figure 1). The aqueous extract from *Ulva intestinalis* was associated with the lowest percentage of viability, 23% compared to the negative control, whereas the aqueous extract from *Undaria pinnatifida* had the lowest impact on fibroblast count after 48h, with a percentage of viability around 70% compared to the negative control. For most of the other

extracts, the percentage of viability ranged between 50 and 62% compared to the negative control. Furthermore, the cell count was assessed at t_0 and after 48h: after 48h of incubation regardless of the extract, the fibroblast count was higher than at t_0 (data not shown). Thus, this negative impact was more due to a reduced growth velocity than a cytotoxicity of the extracts.

3.3. Effect of aqueous extracts on collagen production

To study the effect of aqueous extracts on collagen synthesis in cultured NHDF, the cells were incubated with aqueous extracts at 1 mg.mL^{-1} for 48h and their collagen production was assessed using the Sirius red assay.

For the collagen biosynthesis assay, three aqueous extracts showed a strong increase in production. Indeed after 48h, the collagen in the wells incubated with *Ulva intestinalis*, *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum* extracts was increased by 30, 38 and 43%, respectively compared to the wells incubated with the negative control (Figure 2A). Four other aqueous extracts induced an increase in collagen concentration by about 10% compared to the negative control: the two aqueous extracts from *Ulva lactuca*, and those from *Chondrus crispus* and *Undaria pinnatifida*. Conversely, the collagen concentration was decreased after incubation with the extracts from *Himanthalia elongata*, *Saccharina latissima* and *Undaria pinnatifida*.

However, we showed that after incubation with the seaweed extracts, the growth rate of NHDF was reduced compared to that of cells incubated with the negative control, thus impacting the collagen production per well. The collagen synthesis expressed as the production per cell (Figure 2B) was higher after incubation with all seaweed extracts compared to the negative control. This effect was particularly strong in NHDF incubated with the extract from *Ulva intestinalis*, with an average increase of more than 400% in collagen synthesis compared to cells incubated with the negative control. The other extracts also induced an increase in collagen production which ranged between 50% for the extracts from *Laminaria digitata* and *Undaria pinnatifida* and 110% for that from *Ascophyllum nodosum*. The results showed that the extracts from *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* were of particular interest, with a limited effect on the growth rate of NHDF while inducing by 40% collagen production per well compared to the negative control. Furthermore, the extract from *Ulva intestinalis* was also able to significantly increase the collagen production per cell, so that the collagen production per well was increased by about 30% despite the very limited number of cells in the wells compared to the negative control.

Regarding these results, we decided to further investigate these three macroalgae in the second part of the study, which aimed to identify more precisely the fraction responsible for excessive collagen production.

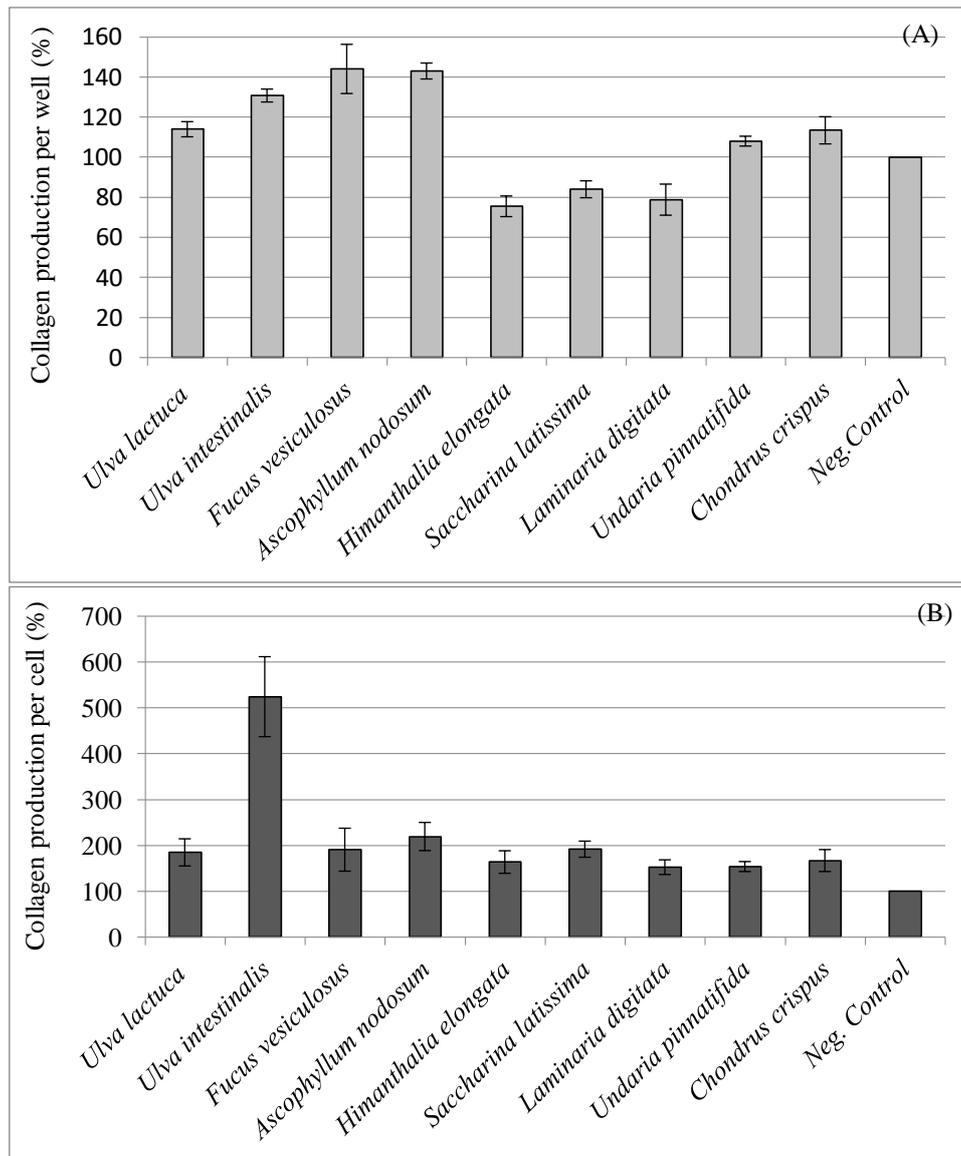


Figure 2. Collagen production in human dermal fibroblasts incubated for 48h with seaweed aqueous extracts. Results are expressed as a % of increase compared to the negative control, per well (A) and per cell (B). The negative control was DMEM containing 1% of antibiotics.

3.4. Biochemical composition of the “proteins fractions”

The aqueous extracts were very complex extracts (table 1), that mainly contained proteins and polysaccharides. Proteins and polysaccharides in the aqueous extracts from *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Ulva intestinalis* were isolated by precipitations and their biological activity was assessed by MTT and Sirius red assays. Six fractions were precipitated and tested: three protein fraction (PRF), namely A-PRF, F-PRF and U-PRF and three polysaccharide fractions (PSF), namely A-PSF, F-PSF and U-PSF.

A-PRF, F-PRF and U-PRF contained between 62.7 and 67.4% of proteins and less than 7% of polysaccharides while A-PSF, F-PSF and U-PSF contained less than 4% of contaminant proteins (Table 2). Furthermore, the PSF were rather rich in polyphenols, in particular the

Résultats, partie B.2.

fractions extracted from *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* with about 20% dry weight while the fraction extracted from *Ulva intestinalis* did not exceed 10% dry weight. The precipitation procedure used was thus an effective method to separate the two major components of aqueous extracts from *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum* and *Ulva intestinalis*.

Table 2. Chemical composition of the protein and polysaccharide fractions after precipitation (dw%)

		Yield (% dry weight of AE)	Biochemical composition (% dry weight of aqueous extract)				
			Proteins	Neutral Sugar	Uronic acid	Sulfates	Polyphenols
Protein fraction	<i>Fucus vesiculosus</i> (F-PR)	33.8	62.7	1.2	nd	0.3	2.4
	<i>Ascophyllum nodosum</i> (A-PR)	26.5	66.6	5.5	nd	1.3	2
	<i>Ulva intestinalis</i> (U-PR)	15.8	67.4	5.5	nd	3.2	1.4
Polysaccharide fraction	<i>Fucus vesiculosus</i> (F-PS)	54.3	3.2	22.5	17.4	6.6	18.7
	<i>Ascophyllum nodosum</i> (A-PS)	43	3.9	52.9	22.5	8.1	18.7
	<i>Ulva intestinalis</i> (U-PS)	21.9	3.4	38.3	15.7	5.8	9.9

3.5. Effect of the different fractions on dermal fibroblast proliferation

NHDF viability was assessed after 48h of incubation with the different fractions (PR and PS) using the MTT assay.

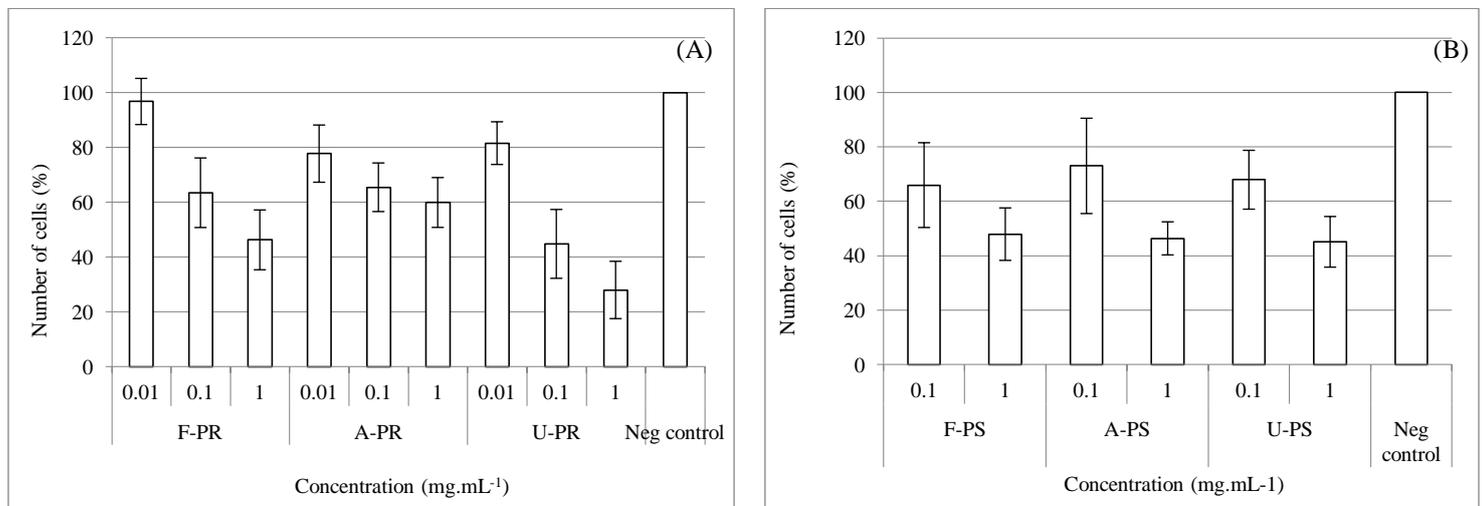


Figure 3. Effect of protein (A) and polysaccharide (B) fractions on fibroblast proliferation in vitro compared to the negative control. Human dermal fibroblasts were incubated with the samples for 48h. MTT assay was then performed. The negative control was DMEM containing 1% of antibiotics.

The viability of cells incubated with the PS and PR was dose-dependent and quite similar (Figure 3). Indeed, at the highest tested concentration (1 mg.mL^{-1}) there were about 50% less cells in stimulated wells than in wells containing the negative control for the six fractions. Only U-PR was lower, around 30% and A-PR slightly higher, 60%. A number of cells of about 60-70% compared to the negative control was found in fibroblasts incubated with the fractions at 0.1 mg.mL^{-1} (except for U-PR which was lower). As with the aqueous extracts, all the tested fractions decreased the growth rate of NHDF. The impact of PR at 0.01 mg.mL^{-1} on fibroblast proliferation was rather limited, with a cell count of about 80% compared to the negative control for A-PR and U-PR and about 100% for F-PR (Figure 3A).

The collagen produced by dermal fibroblasts incubated with the PR or PS was then quantified using the same method as that used for aqueous extracts.

3.6. Impact of PRF and PSF on collagen production:

The collagen production by the fibroblasts incubated with the different fractions was dose-dependent. First of all, we showed that the increase in collagen production in the wells incubated with the aqueous extracts was not due to the PS but to the PR as shown on Figure 4. In wells stimulated with PS, no increase in collagen production was observed compared to the negative control, with a production between 70% and 100% compared to that of cells incubated with the negative control (Figure 4B). Although the collagen production per cell was increased after incubation with the PS at 1 mg.mL^{-1} (by about 50% for U-PS and F-PS and 100% for A-PS), this activity was lost at 0.1 mg.mL^{-1} for all fractions (Figure 4D).

Conversely, the collagen production by fibroblasts incubated with the PRF was strongly impacted compared to that of cells incubated with the negative control. For all fractions, a marked dose response was observed (Figure 4A and 4C) and the concentration of total collagen was strongly and significantly increased compared to the negative control. The incubation with F-PRF and U-PRF led to similar results (Figure 1A) with an increase in production by about 50% and 25% at 1 mg.mL^{-1} and 0.1 mg.mL^{-1} , respectively. In the wells incubated with U-PRF and F-PRF at 0.01 mg.mL^{-1} , no increase in collagen production was observed and results were similar to those obtained with the negative control. Although the production per well was similar for the cells incubated with U-PRF and F-PRF, the same activity was not observed on individual cells (Figure 4C). Indeed, we showed previously that the number of cells in wells incubated with U-PRF at 1 and 0.1 mg.mL^{-1} was decreased compared to the wells incubated with F-PRF. Thus, the collagen production per cell after incubation with U-PRF was significantly higher, especially at 1 mg.mL^{-1} , with an increase in collagen produced per cell by about 400% compared to the negative control.

The A-PRF also had a very interesting activity on collagen production, leading to a significant increase in the total amount of collagen deposited by NHDF. The collagen production was 100%, 70% and 50% higher than that of cells incubated with the negative control at 1 , 0.1 and 0.01 mg.mL^{-1} , respectively. The maintenance of a high activity at 0.1 mg.mL^{-1} was particularly interesting as it was also accompanied by a quite small impact on cell proliferation (Figure 3A).

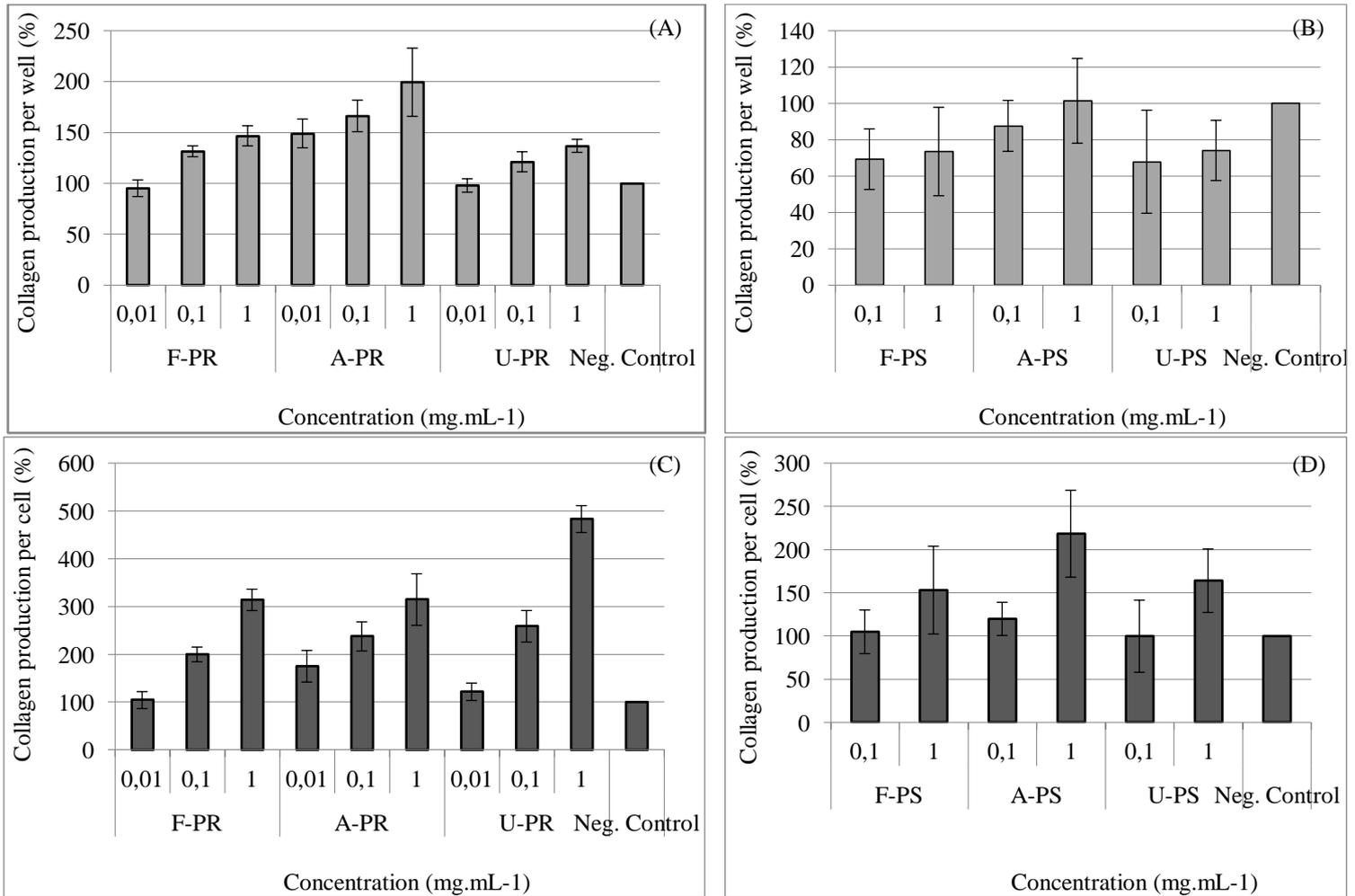


Figure 4. Collagen production in human dermal fibroblasts incubated for 48h with protein fractions (A) and (C) or polysaccharide fractions (B) and (D). Results are expressed as a % of increase compared to the negative control per well (A) and (B) or per cell (C) and (D). The negative control was DMEM containing 1% of antibiotics.

Discussion:

Skin aging is a complex process consisting of both intrinsic and extrinsic aging. It may lead to many changes in skin appearance, including thinning, loss of elasticity, dryness, and wrinkles. Aging rate and effects may be slow down through the limitation of the degradation of the extracellular matrix (ECM) and its components, especially collagen.

In this study, we first investigated collagen production by NHDF incubated with different macroalgal aqueous extracts. The tested macroalgae belonged to the three categories of macroalgae: green, brown and red. The aqueous extraction allowed to recover the hydrosoluble compounds of each alga. We showed that the biochemical composition of each aqueous extract varied from one extract to another.

First of all, we showed that the aqueous extracts negatively impacted cell proliferation by reducing their growth rate. The count of fibroblasts incubated with the aqueous extract from

Ulva intestinalis was significantly decreased after 48h of incubation compared to the cells incubated with the negative control. Despite this inhibition of cell proliferation, some aqueous extracts had interesting stimulatory effects on collagen production. Among the brown algae, the aqueous extracts from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum* had the strongest activity on collagen production whereas the extracts from *Saccharina latissima*, *Undaria pinnatifida* and *Laminaria digitata* seemed ineffective. Despite its negative impact on the cell count, the aqueous extract from *Ulva intestinalis* was associated with an interesting stimulatory effect on collagen production.

A remarkable feature of this study was the assessment of the collagen production per cell. Indeed, all extracts had the ability to stimulate collagen production per cell, showing that the seaweed extract stimulatory effect on collagen production was not due to an increased proliferation rate, like conventional stimulants (Jones et al. 2013), but rather to the stimulation of collagen production in individual cells.

This result was of particular interest as it suggested that, while the seaweed extracts appeared to have some inhibitory effects on fibroblast proliferation, the stimulatory effects on collagen production were so strong that, despite a decrease in cell count, the concentration of collagen produced by NHDF was significantly higher than that measured in cells stimulated with the negative control.

Three aqueous extracts were especially interesting and further analyzed: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Ulva intestinalis*. These three macroalgae underwent two precipitation procedures in order to recover two fractions: a protein-rich fraction (PR) and a polysaccharide-rich fraction (PS) that were tested to identify the active fraction(s).

Interestingly, we showed that the PSF had no activity on collagen production by NHDF. The PS fractions extracted from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*, i.e. F-PS and A-PS, which are rich in fucoïdanes, had no impact on fibroblast proliferation or collagen production. This result was not in line with previous studies that showed that fucoïdanes were capable to down-regulate the pro-collagen I synthesis (Moon et al. 2009). Furthermore, in the cells cultured with fucoïdanes, they have shown that the expression of MMP-1 mRNA was significantly decreased.

Regarding U-PSF, which was mainly composed of rhamnose-rich polysaccharides, the so-called ulvans, this fraction had no impact on collagen production by NHDF. These results are concordant with a previous study on the impact of rhamnose-rich oligo- and polysaccharides (Ravelojaona et al. 2008) that has shown that dermal fibroblasts at their earliest passage (7th) incubated with two fractions of commercial bacterial rhamnose-rich polysaccharides with an average molecular weight of 50 kDa and 5 kDa did not significantly increase collagen synthesis. Only at the latest passage (12th), the fibroblasts produced a significantly higher amount of collagen when incubated with low molecular weight rhamnose-rich polysaccharides than after incubation with the negative control (the high molecular molecule had a negative impact on collagen synthesis). However, other studies have concluded that rhamnose-rich polysaccharides could stimulate collagen biosynthesis in fibroblast culture, showing that fibroblasts contain lectins that could recognize rhamnose moieties (Andrès et al.

2006; Faury et al. 2008). However, the study by Andres et al. has also shown that not all rhamnose-rich fractions had the same activity on collagen production since two rhamnose-rich polysaccharides of 50 and 45 kDa also containing galactose and glucuronic acid but with different repeating subunits led to different effects on collagen biosynthesis (one was inactive while the other led to a synthesis increased by 20%).

Conversely, PR fractions, i.e. U-PR, A-PR and F-PR led to a strong dose-response effect on collagen production. U-PR significantly reduced the growth rate of fibroblasts but the production per cell incubated with this fraction was strongly increased both at 1 and 0.1 mg.mL⁻¹. This result was particularly noteworthy as it showed that, although U-PR seemed to have an inhibitory effect on fibroblast proliferation, the stimulation of collagen production in individual cells was so strong that the collagen production was increased compared to cells incubated with the negative control. F-PR also promoted the collagen stimulation but to a lesser extent than A-PR. Indeed, A-PR was the most interesting as it had a limited effect on fibroblast proliferation compared to U-PR and the capacity to strongly increase collagen synthesized by NHDF, regardless of the concentration tested (1, 0.1 and 0.01 mg.mL⁻¹). Some cosmetic products containing algal proteins or peptides (usually from microalgae) able to stimulate collagen production are already marketed but further investigations are still needed to discover the full potential of these types of compound in skin care.

Further studies are also needed to improve our understanding of the underlying mechanisms of this increase in collagen production by dermal fibroblasts. However, we demonstrated that collagen production in wells incubated with the different extracts was increased as a consequence of an increase in collagen production per cell and not due to fibroblast proliferation.

Acknowledgement:

We are very grateful to the “Association nationale de la recherche et de la technologie”, for contributing to this work by providing a part of a PhD funding.

B.3. Production-pilote d'ulvanes de différents poids moléculaires extraits d'*Ulva sp.* et leurs effets sur la biosynthèse de collagène et d'acide hyaluronique par des fibroblastes dermiques humains

Résumé

Des ulvanes de différentes masses moléculaires ont été testés pour leur potentiel cosmétique *in vitro* sur des fibroblastes dermiques humains. Les ulvanes bruts (ULVAN-01) ont été extraits par le procédé breveté développé par la société SEPROSYS (procédé SEPROSYS®) qui ne nécessite d'utiliser ni acide ni solvant. Ces ulvanes bruts ont ensuite été dépolymérisés sur résine d'échange d'ions pour obtenir un ulvane de bas poids moléculaire (ULVAN-DEP). Chaque ulvane a ensuite été ajouté au milieu de culture de fibroblastes dermiques humains et la prolifération des cellules ainsi que la biosynthèse de collagène et d'acide hyaluronique ont été mesurées après le traitement.

Dans cette étude, nous avons montré que l'ulvane brut ULVAN-01 diminuait la vitesse de croissance des fibroblastes tandis que l'ulvane dépolymérisé ne montrait pas d'impact significatif sur celle-ci.

Les différents ulvanes testés n'ont pas montré d'effet significatif sur la production de collagène des fibroblastes dermiques par rapport au contrôle négatif. Au contraire, des résultats intéressants ont été obtenus pour la production d'acide hyaluronique puisque les deux extraits d'ulvanes ont significativement favorisé l'augmentation de sa production par les fibroblastes. De plus, nous avons mis en évidence une influence importante du poids moléculaire. Ainsi, il ressort de cette étude que les ulvanes bruts et dépolymérisés présentent un potentiel d'utilisation dans le domaine de la dermo-cosmétique.

Ces résultats font l'objet d'un article publié dans Carbohydrate Polymers et d'une demande de brevet (numéro de demande FR1670618)

Pilot production of ulvans from *Ulva sp.* and their effects on hyaluronan and collagen production in cultured dermal fibroblasts

Amandine Adrien^{1,2}, Antoine Bonnet¹, Delphine Dufour², Stanislas Baudouin², Thierry Maugard¹, Nicolas Bridiau^{1*}

¹ Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSS, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

² SEPROSYS, Séparations, Procédés, Systèmes, 12 Rue Marie-Aline Dusseau, 17000 Rochelle, France.

**Author for correspondance (Address: Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSSs, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. Fax: +33 546458791; E-mail: nicolas.bridiau@univ-lr.fr)*

Abstract

Ulvans from *Ulva sp.* were tested for their potential cosmetic properties on human dermal fibroblasts. The crude ulvans (ULVAN-01, 57 kDa), extracted using a patented acid- and solvent-free process, were subjected to depolymerization using ion exchange resin to obtain a low molecular weight ulvan (ULVAN-DEP, 4 kDa). The biochemical characterization and UHPLC-HRMS analyses of these extracted ulvans showed that they were of high purity and predominantly composed of a repeated ulvanobiouronic acid disaccharide.

Fibroblast proliferation, as well as hyaluronan and collagen release was assessed, demonstrating that ULVAN-01 reduced fibroblast proliferation rate while ULVAN-DEP had no significant effect. Both ulvans were ineffective to induce collagen production but induced a significant increase in hyaluronan production, with a strong influence of the molecular weight. Thus, crude and depolymerized ulvans had different metabolic activities on dermal fibroblasts, which makes them promising to envisage further development in the skin care field.

Key words: green seaweed; ulvan; human dermal fibroblast; collagen; hyaluronan; skin care.

1. Introduction

The skin aging process is really complex and is the result of two independent biological processes called extrinsic aging and intrinsic aging. Human skin aging has different consequences, including a strong change in the extracellular matrix (ECM) of the dermis responsible for its sagging. The skin structure and function largely depend on the nature and content of the ECM components in the dermis. Among the different ECM components involved in skin aging, two biomolecules are of particular interest: collagen and hyaluronan, whose amount and quality decrease with aging.

Hyaluronan (or hyaluronic acid) is a high molecular weight linear glycosaminoglycan composed of repeated β -1,4-linked D-glucuronic acid (GlcA) and β -1,3-linked *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) disaccharide units (Meyer 1958), mainly synthesized by fibroblasts and keratinocytes. It is found in all vertebrate tissues but skin hyaluronan accounts for more than 50% of total body hyaluronan (Reed, Lilja, et Laurent 1988). Hyaluronan plays important biological roles in the skin, especially in the dermis, where it is responsible for regulating water balance and maintaining cell structure through its high water retention and viscosity properties (Stern et Maibach 2008), thus holding moisture or maintaining tissue architecture and elasticity (Laurent et Fraser 1992; Manuskiatti et Maibach 1996).

An age-dependent decrease in hyaluronan content has been identified as one of the major factors responsible for the physical appearance of aged skin, including wrinkle formation and the loss in skin elasticity (Longas, Russell, et He 1987; Ghersetich et al. 1994).

Nowadays, natural cosmetics represent a minor fraction of the cosmetics market compared to conventional cosmetics. However, in recent years, the consumer demands for natural products have influenced the cosmetic industry that has increasingly incorporated natural ingredients in its products. Although plant-derived compounds are gaining popularity, marine products, in particular seaweeds, are a rich source of biological and chemical diversity (Balboa et al. 2015). *Ulva sp.* is a marine macroalgae commonly found on the French Atlantic coast but it remains underexploited at an industrial level. However, several studies have shown that *Ulva sp.* macroalgae are capable of synthesizing a wide range of key nutrients such as proteins, minerals and fibers (Lahaye 1991; Mabeau et Fleurence 1993; Fleurence 1999) and are also an important source of polysaccharides, including sulfated polysaccharides called ulvans, which are responsible for number of their biological activities such as immune modulation, anti-viral and anticoagulant properties (Lahaye et Robic 2007) that might be useful in nutraceutical, pharmaceutical and cosmetic applications.

In this study, we used a previously developed acid-free and solvent-free procedure to extract and purify ulvans from *Ulva sp.*. This patented procedure was developed by the SEPROSYS company (FR2998894 (B1)). We also developed a depolymerization procedure using ion exchange resin in order to produce low molecular weight (LMW) ulvans. The influence of ulvans isolated from *Ulva sp.* and their molecular weight on hyaluronan and collagen production by normal human dermal fibroblasts (NHDF) was investigated.

2. Material and methods

2.1. *Material*

The green macroalgae *Ulva sp.* were cultivated in a pond in the “Ferme du Douhet”, a marine farm in Ile d’Oléron, France. They were collected in spring 2012 and sun-dried.

Except when otherwise stated in the text, all chemical reagents were purchased from Sigma Aldrich, France.

2.2. *Methods*

2.2.1. *SEPROSYS extraction procedure*

A total of 500 g of *Ulva sp.* leaves were washed in 15 L of distilled water for 10 min at room temperature and wrung with a fabric cone to remove as much water as possible. The washed algae were then ground in 5 L of distilled water at 80°C until obtaining 2-mm particles. The 5 L of minced algae in water were transferred in a thermostated tank at 80°C containing 2.5 L of distilled water. The extraction was made under constant agitation with a bladed stirrer at a rotation speed of 10 spins/minute for 2 h. The pulps were then removed from the tank and filtered with the fabric cone to collect the aqueous extract. Then, 13 L of extract were recovered and filtered with an ultrafiltration unit equipped with a 15 kDa Kerasep KBW membrane (Novasep Process, France). The filtration was carried out at 80°C at a pressure of 5 bars and a circulation flow of 450 L/h (circulation speed of 5 m/s) until obtaining a retentate around 4°B. Then, 1.5 L of retentate was demineralized by passage on a column containing 100 mL of Amberlite FPA 98, a strong anionic resin in the OH⁻ form, in series with a column containing 200 mL of Amberlite IR 120 Na, a strong cationic resin in the H⁺ form. The circulation was processed with a peristaltic pump at a flow rate of 2 BV/h. The deionized product was finally decanted in a water bath at 80°C for 2 h. After centrifugation at 5,000 g for 15 min at room temperature, the extract, referred to as ULVAN-01 was neutralized to pH7 with 1M NaOH and lyophilized (Figure 1).

2.2.2. *Depolymerization procedure*

2.2.2.1. *Preliminary test*

100 mL of a solution of ULVAN-01 at 25 mg.mL⁻¹ were prepared and depolymerized on the resin AMBERLITE™ FPC23 H. The depolymerization circuit consisted of ULVAN-01 solution, a peristaltic pump and a column containing 10 mL of AMBERLITE™ FPC23 H. The polysaccharide solution and the column were maintained at 80°C throughout the experiment. The output was set at 12 mL.min⁻¹. Every hour for 8 h and after 22 h and 30 h, 1 mL aliquots were collected. Depolymerization was followed by high-performance gel permeation chromatography.

2.2.2.2. Production of the different fractions

After identifying the depolymerization time corresponding to the expected MW, the fractions were similarly prepared. The depolymerization reaction was stopped at the right time for each fraction and the pH was neutralized with 0.1M NaOH. After dialysis against distilled water (molecular cut-off of 1 kDa), the fractions referred to as ULVAN-DEP were freeze-dried and stored at -20°C until further analysis.

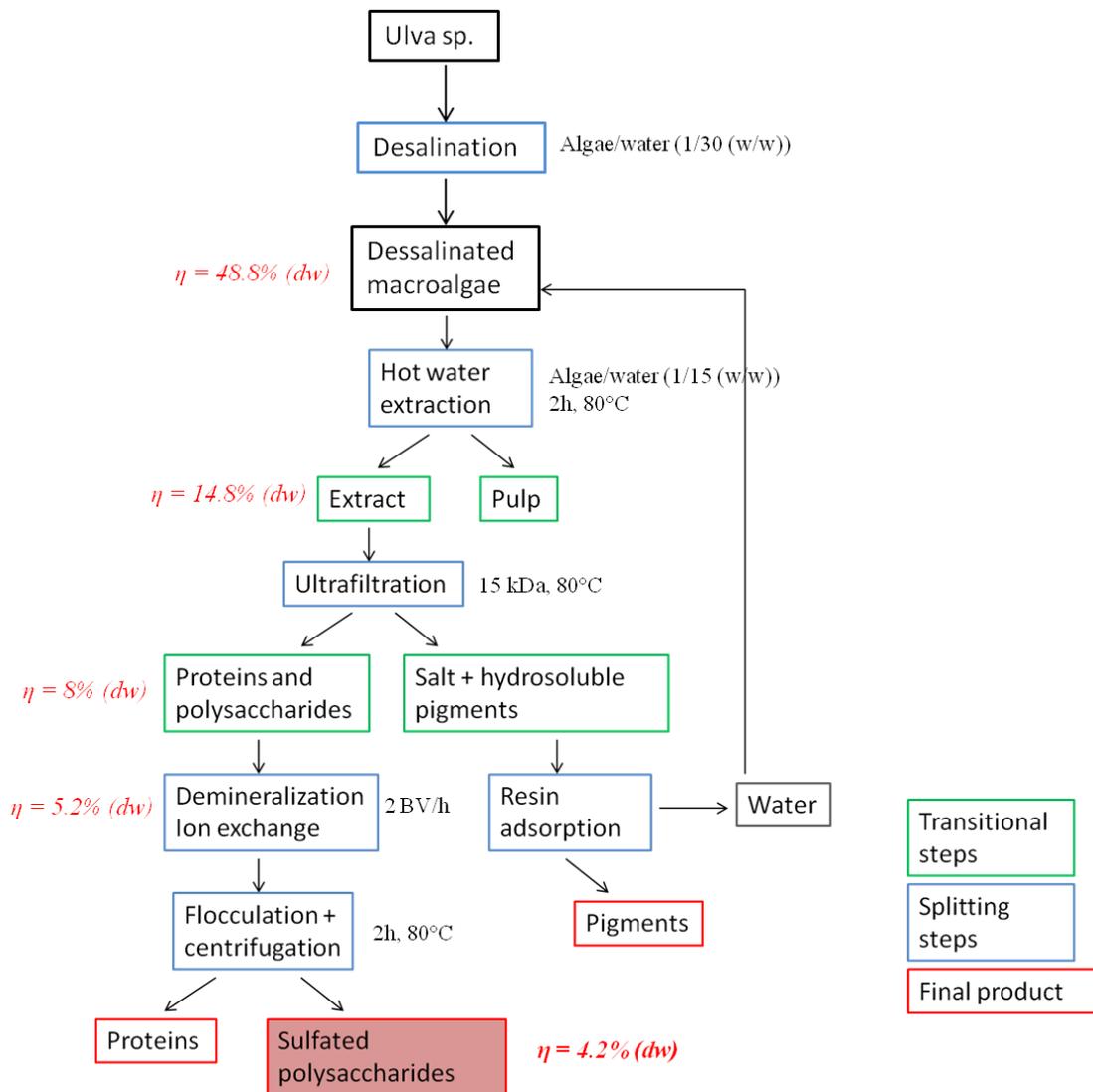


Figure 1. Different steps and yields (η) of the extraction procedure developed by SEPROSYS

2.2.3. Chemical composition

Neutral sugar content was determined according to the phenol-sulfuric method (Dubois et al. 1951) using rhamnose as a standard. Uronic acid content was measured as described by (Filisetti-Cozzi et Carpita 1991) using glucuronic acid as a standard. Protein content was

determined using the Bradford protein assay (Bradford 1976) using bovine serum albumin as a standard. Sulfate content was obtained using 3-amino-7-(dimethylamino)phenothiazin-5-ium chloride (Azure A), which binds sulfated groups in a polysaccharide chain (Gao et al. 2003; Jaques et al. 1968) using dextran sulfate as a standard. The quantitation method of polyphenols was adapted from the original one (Singleton et Rossi 1965), using gallic acid as a standard. Ash content was determined by measuring the mass loss of samples heated for 15 h at 550°C.

2.2.4. High-performance gel permeation chromatography

The structural and quantitative analyzes of the polysaccharide extracts were performed on a HPLC Agilent technologies 1100 LC/RID system using successively two 30-cm size-exclusion chromatography columns: TSK gel 5000 PW and TSK gel 4000 PW. The analysis temperature was stabilized at 30°C and 20 μL of extract or sample at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ were injected. The products were eluted with 0.1M sodium nitrate at a flow rate of 0.5 mL/min and detected and quantified by differential refractometry using HP Chemstation software off-line for the processing. The standard curve was made using dextran standards ranging between 1,000 and 50,000 Da. Number-averaged molecular weight (M_n), weight-averaged molecular weight (M_w) and polydispersity index (I) were calculated as follows (F. Ye et al. 2009):

$$\begin{aligned} M_n &= (\sum N_i \times M_i) / \sum N_i && \text{where } N_i \text{ was the number of moles of polymer} \\ M_w &= (\sum N_i \times M_i^2) / (\sum N_i \times M_i) && \text{species, } M_i \text{ the molecular weight of polymer} \\ I &= M_w / M_n && \text{species} \end{aligned}$$

The depolymerization of ULVAN-01 was also followed by high-performance gel permeation chromatography, using the same system and similar conditions, except that one column TSK-GEL G3000SW and two TSK-GEL G2000SW were mounted in series and the products were eluted with 0.1M ammonium acetate at a flow rate of 1 mL/min .

2.2.5. Cell culture

NHDF were obtained from ATCC (Manassas, USA): product code CCD-1059Sk (ATCC® CRL-2072™), lot number 62062292. They came from the skin of a 20-year old woman, according to the provider's information. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAN Biotech, Dutscher) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (PAN Biotech, Dutscher) and 1% of antibiotics (penicillin/streptomycin 10,000 U/10 mg/mL (v/v)) (PAN Biotech, Dutscher), used as the complete culture medium. The cells were cultured in a temperature-controlled, humidified incubator with 5% CO_2 at 37°C. The cells were grown in 75 cm^2 surface ventilated culture flasks (BD Falcon) and subcultured by trypsinization (0.05% trypsin, PAN Biotech). The culture medium was changed every 2 or 3 days. Cells were used between the 3rd and 8th passages for the experiments.

2.2.5.1. Cell proliferation

The MTT test was used according to the method described by Mosmann (Mosmann 1983). It is a colorimetric assay allowing to assess cell proliferation, based on the reduction of a yellow tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), by living cells. In the presence of mitochondrial succinate dehydrogenase found in active living cells, the tetrazolium ring of MTT is reduced and forms a violet product: formazan. The yellow solution becomes purple and the intensity of the purple coloration is proportional to the number of living cells.

Briefly, cells at 5×10^4 cells/mL in 100 μ L of complete culture medium were seeded in 96-well plates (BD Falcon) and incubated for 24 h. The medium was then removed and 100 μ L of samples prepared in DMEM containing 1% of antibiotics or negative control (DMEM containing 1% of antibiotics without samples) were added into the wells. After 48 h, 25 μ L of MTT (5% in PBS) were added into each well and the plates were incubated for 4 h at 37°C. The medium was then removed and 200 μ L of dimethyl sulfoxide were added into each well, prior to incubation for 10 minutes and absorbance reading at 550 nm using a Fluostar Omega microplate reader (BMG LABTECH, Germany).

2.2.5.2. Analysis of collagen production

NHDF were seeded at a density of 5×10^4 cells/well into 24-well culture plates in complete culture medium. After 24 h, the medium was removed and 1 mL of samples or negative or positive control in DMEM containing 1% of antibiotics (penicillin/streptomycin 10,000 U/10 mg/mL (v/v)) (PAN Biotech, Dutscher) was added into each well. Plates were incubated for 48 h at 37°C and the collagen production was then measured using the Sirius red staining procedure. Briefly, the medium was removed and cells were washed twice with PBS then fixed for 1 h with 1 mL of Bouin's solution at room temperature. Following fixation, the Bouin's solution was removed and cells were washed twice with distilled water. Cells were then stained with 1 mL of Sirius red solution (0.5 g of Sirius Red 80 in 500 mL of saturated aqueous solution of picric acid) for 1 h under shaking at room temperature. Samples were then washed successively with distilled water and 0.01M HCl to remove unbound dye. The bound dye was finally solubilized in 500 μ L of 0.1M NaOH for 1 h under shaking and absorbance was read at 550 nm using a Fluostar Omega microplate reader (BMG LABTECH, Germany).

2.2.5.3. Hyaluronan quantification

Hyaluronan levels were quantified using an ELISA-like hyaluronan test plate (R&D Systems, USA). Briefly, cells at 5×10^4 cells/mL in 100 μ L of complete culture medium were seeded in 96-well plates (BD Falcon) and cultured for 24 h. The medium was then removed and 150 μ L of samples prepared in DMEM containing 1% of antibiotics (penicillin/streptomycin 10,000 U/10 mg/mL (v/v)) (PAN Biotech, Dutscher), or a positive (TGF- β at 0.01 μ g/mL) or negative control (DMEM containing 1% of antibiotics alone) were added into the wells. After 72 h, the concentration of hyaluronan in the supernatants was measured according to the manufacturer's instructions.

2.2.7. Statistical analysis

All data were presented as means \pm standard deviation, resulting from at least triplicate tests. The Student's t-test (independent, two-sided) was applied to determine significant differences between experimental and control samples, using Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, USA).

3. Results and discussion

3.1. Production and characterization of Ulvan fractions

3.1.1. Production and biochemical composition of ULVAN-01

ULVAN-01 was extracted from the green algae *Ulva sp.* in hot water and purified using different steps: ultrafiltration, ion exchange and precipitation of the remaining proteins. After neutralization with NaOH, the sulfated polysaccharides were in a sodium salt form. The extraction yield of the ulvans represented about 5% of the non-desalinated dry macroalgae which contained about 50% of salts (Figure 1). The extraction and purification procedures of ulvans from *Ulva sp.* allowed effective purification of the sulfated polysaccharides as there were less than 4% of contaminant proteins remaining in ULVAN-01. Neither polyphenols nor lipids were found in the extract. ULVAN-01 also contained 23% of ashes. ULVAN-01 contained 41% of neutral sugars and 34% of uronic acids, a value which was in the higher range of a previous analysis of ulvans from *Ulva* species (Marc Lahaye et al. 1999). Conversely, the sulfate content of ULVAN-01 was of 11%, a value which was in the lower range of previous studies on ulvans (Lahaye et al. 1999; Lahaye et Robic 2007). A very remarkable feature of the extraction procedure developed by SEPROSYS was the high purity of the resulting ulvans.

3.1.2. Production of ULVAN-DEP

The depolymerization of ULVAN-01 using the ion exchange resin was very effective. After 22 h, all high molecular weight (HMW) polysaccharides were depolymerized (Figure 2A). The procedure allowed to decrease ULVAN-01 molecular weight, which led after 24 h to the formation of ULVAN-DEP, exhibiting an average molecular weight around 4 kDa (Figure 2B). It is noteworthy that this depolymerization procedure allowed to keep 70% of the sulfates linked to the polysaccharide backbone.

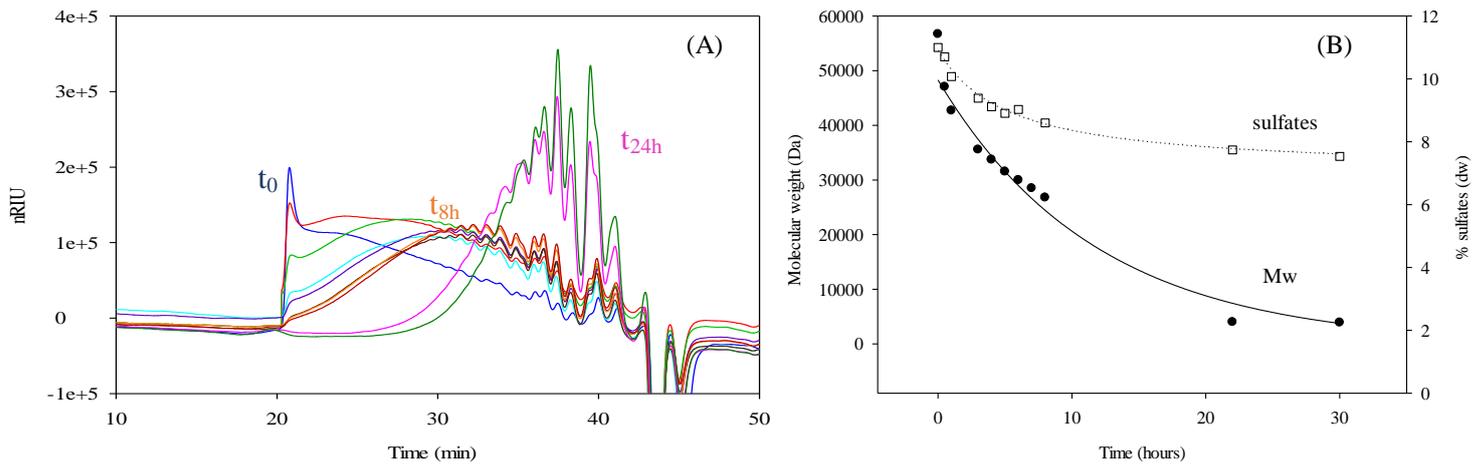


Figure 2. (A) Time-course of ULVAN-01 depolymerization followed by high-performance gel permeation chromatography. (B) Evolution of the molecular weight (Mw) and % of sulfates (dw) of ULVAN-01 during depolymerization using an ion exchange resin (AMBERLITE™ FCP23 H).

3.1.3. Structural characterization of the ulvan fractions

A molecular weight of about 57 kDa was estimated by gel permeation chromatography for ULVAN-01, based on a calibration curve of dextran standards (table 1). As previously shown, ULVAN-DEP was obtained with a molecular weight of around 4 kDa.

Table 1. Structural characterization of ULVAN-01 and ULVAN-DEP.

	Mn (Daltons) $= \sum Ni * Mi / Ni$	Mw (Daltons) $= \sum Ni * Mi^2 / \sum Ni * Mi$	I
ULVAN-01	31,323	56,711	1.8
ULVAN-DEP	1,470	4,137	2.8

3.2. Effects of the ulvan fractions on fibroblast proliferation

The aim of this study was to investigate the effects of the different ulvan fractions extracted using SEPROSYS procedure, as well as the effect of the depolymerization of the extracted ulvans on NHDF proliferation and collagen and hyaluronan productions, two major ECM components in the dermis.

Figure 3 shows the effect of ulvan extracts on fibroblast counts after 72 h of incubation. Compared to a conventional hyaluronan stimulant, TGF- β , and the negative control (culture medium), the cell count was decreased after incubation with ulvan extracts. This decrease was greater with the non-depolymerized extract ULVAN-01, with a reduction by 36% and 50% after incubation with ULVAN-01 at 100 and 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively, compared to the negative control. This antiproliferative activity was most likely due to a cytostatic effect

rather than a cytotoxic effect, giving that we did not observe any alteration of fibroblast morphology, when checking the cells with optical microscopy during the cultures. This would indicate that the metabolism of the fibroblasts incubated with ULVAN-01 was preferentially oriented towards hyaluronan biosynthesis rather than cell growth, leading to the slowdown in cell growth rate. Conversely, the depolymerized extract ULVAN-DEP exhibited almost no antiproliferative activity: a slight decrease of 17% in cell number was observed at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while the cell number in the wells treated by ULVAN-DEP at 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was comparable to that of the negative control. These results were in line with previous studies showing that the molecular weight of a polysaccharide influenced fibroblast proliferation. Previous studies on LMW fucans (Logeart et al. 1997) and galactofucans (Laurie-Eve Rioux et al. 2013), smaller than 8 kDa and 10 kDa, respectively, concluded that these polysaccharides had no effect on cell proliferation. However, the same study on galactofucans also showed that HMW polysaccharides of 638 and 1,529 kDa reduced human skin fibroblast proliferation. Although our results were concordant with these findings, they highly differed from those of another study that showed that rhamnose-rich polysaccharides from bacteria with molecular weight ranging between 5 and 50 kDa strongly induced cell proliferation by 40-80% (Andrès et al. 2006). In our study, only the stimulant TGF- β was able to increase fibroblast proliferation by 39% compared to the negative control.

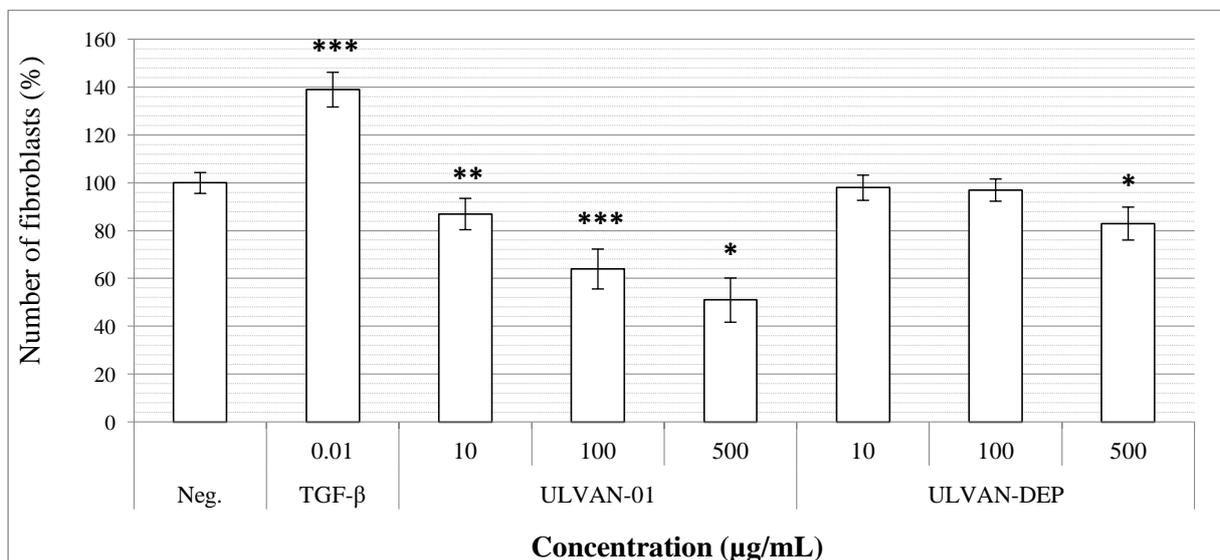


Figure 3. Effect of ulvan extracts on fibroblast proliferation in vitro. Human dermal fibroblasts were incubated with the samples for 72 h. MTT assay was then performed. The negative control was DMEM containing 1% of antibiotics. Significant differences between values obtained with extracts and negative control are indicated by * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

3.3. Effects of the ulvan fractions on hyaluronan production

The effects of ulvan extracts on the production of the major ECM component of the dermis, hyaluronan, were analyzed using an ELISA-like kit on the supernatants of NHDF cultures. The results indicated a very significant increase in the total amount of hyaluronan produced

and released by NHDF incubated with TGF- β and with the ulvan extracts ULVAN-01 and ULVAN-DEP, compared to the negative control (Figure 4). More specifically, 0.01 $\mu\text{g/mL}$ of TGF- β enhanced hyaluronan production by 56% (763 ng/mL versus 487 ng/mL with the negative control). Furthermore, ULVAN-01 induced a significant dose-dependent increase in hyaluronan concentration of 27% and 31%, at 100 and 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively (respective hyaluronan concentrations: 621 ng/mL and 641 ng/mL). The effect of the LMW ULVAN-DEP was even higher, with increases of 13%, 46% and 35% at 10, 100 and 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively (respective hyaluronan concentrations: 554, 713 and 661 ng/mL).

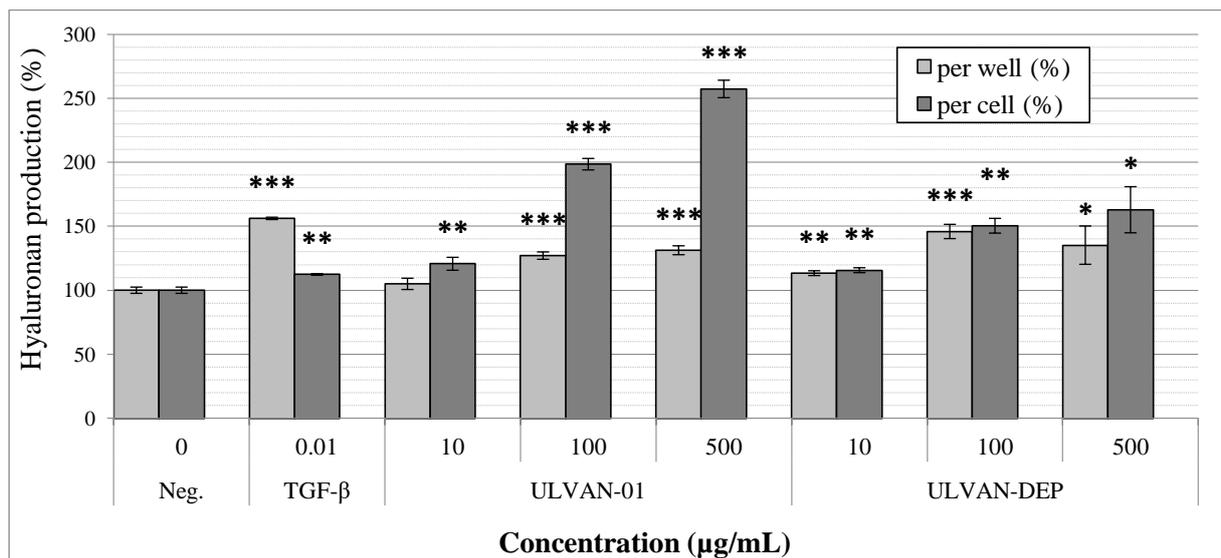


Figure 4. Hyaluronan release by human dermal fibroblasts incubated for 72 h with ulvan extracts. Results are expressed as a concentration of hyaluronan and in a % of increase compared to the negative control (Neg.) per well and per cell. Significant differences between values obtained with extracts and negative control are indicated by * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

Another interesting feature of this bioactivity was the hyaluronan production per cell. In the presence of TGF- β , hyaluronan production per cell was really close to that of the negative control (Figure 4) with only a slight increase of 12% (versus a 56% increase in the hyaluronan production per well), suggesting that in the supernatants of fibroblasts treated with TGF- β , the increased level of hyaluronan production was mostly due to an increase in cell number rather than an increase in hyaluronan biosynthesis. Regarding ulvan extracts, especially ULVAN-01, results were different with a high dose-dependent production of hyaluronan per cell compared to the negative control: 100% and 157% increases with the concentrations of 100 and 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively. This result was of particular interest as it suggested that, although ULVAN-01 appeared to have some inhibitory effects on fibroblast proliferation, its stimulatory effects on hyaluronan production were so significant that, despite a decrease in cell number, the concentration of hyaluronan produced by NHDF was higher than that produced after incubation with the negative control or even with TGF- β .

After depolymerization, ULVAN-DEP had only a slight effect on fibroblast proliferation compared to the negative control; therefore, the cell density had no effect on the final

concentration of hyaluronan compared to the negative control, thus masking the stimulatory effects of ULVAN-DEP. After 72 h of incubation with ULVAN-DEP, the hyaluronan production per cell was greater than that of cells incubated with the negative control, regardless of the tested concentration: 10, 100 and 500 µg/mL of ULVAN-DEP led to respective hyaluronan productions per cell of 565, 735 and 796 ng/mL, corresponding to increases of 15, 50 and 63%, respectively compared to the negative control. Thus, this LMW ulvan had a dose-dependent stimulatory effect on hyaluronan production per cell.

Both ulvan extracts ULVAN-01 and ULVAN-DEP showed a different metabolic activity from that of the conventional stimulant TGF-β, which induced an increase in hyaluronan production mostly by stimulating the growth of fibroblasts. On the contrary, ulvans had the ability to significantly stimulate hyaluronan biosynthesis by fibroblasts rather than their growth. According to these results, ULVAN-01 and ULVAN-DEP seemed both promising to envisage their further development for cosmetic application in the skin care field, but with different modes of action. ULVAN-01 was the most active but also induced a decrease in fibroblast proliferation, likely due to the slowdown in cell growth rate. Despite being less active than ULVAN-01, ULVAN-DEP was still able to stimulate the increase in hyaluronan biosynthesis by dermal fibroblasts, but without negatively influencing cell proliferation.

3.6. Effects of the ulvan fractions on collagen production

The results on collagen production obtained with ULVAN-01 and ULVAN-DEP highly differed from what we concluded for hyaluronan production. Indeed, no significant effect was observed compared to the negative control (data not shown). These results were concordant with a previous study on the influence of rhamnose-rich oligo- and polysaccharides (Ravelojaona et al. 2008) that showed that dermal fibroblasts at their earliest passage (7th) incubated with two fractions of commercial bacterial rhamnose-rich polysaccharides with a mean molecular weight of 50 kDa and 5 kDa did not significantly increase collagen production. Only at their latest passage (12th), the fibroblasts incubated with LMW rhamnose-rich polysaccharides produced an amount of collagen significantly higher than after incubation with the negative control. On the other hand, the HMW rhamnose-rich polysaccharide had a negative effect on collagen production. However, other studies have concluded that rhamnose-rich polysaccharides could stimulate collagen biosynthesis in fibroblast culture, showing that fibroblasts contain lectins that could recognize rhamnose moieties (Andrès et al. 2006; Faury et al. 2008). Nevertheless, the study by Andres et al. also showed that not all rhamnose-rich fractions had the same activity on collagen production since two rhamnose-rich polysaccharides of 50 and 45 kDa also containing galactose and glucuronic acid, but with different repeating subunits, led to different effects on collagen biosynthesis: one was inactive while the other increased the production by 20%.

4. Conclusion

In our study, high purity ulvans were extracted using an acid- and solvent-free procedure. We also developed an effective depolymerization procedure that allowed to produce ulvan

fractions with various MW. This study showed that although the ulvan fractions seemed to have no effect on collagen biosynthesis by NHDF, they significantly and strongly influenced hyaluronan release. ULVAN-01, a 50 kDa-rhamnose-rich polysaccharide, was able to increase hyaluronan production but, unlike the conventional hyaluronan stimulant, TGF- β , the increase was not due to an increase in cell number but to a real activation of the cell metabolism related to hyaluronan biosynthesis. We also concluded that the molecular weight significantly influenced the biological activity of ulvans. First of all, we confirmed for ulvans the observation made with other sulfated polysaccharides extracted from seaweeds (galactofucans and fucoïdanes): LMW polysaccharides had no effect on fibroblast proliferation compared to HMW polysaccharides which reduced it. Furthermore, the effect on cell proliferation was not the only consequence of reducing ulvan molecular weight. Indeed, although the hyaluronan production was induced by LMW ulvans, the release per cell was lower than with the HMW ULVAN-01. ULVAN-01 could thus be of significant interest for skin care treatments as this ulvan extract significantly promotes hyaluronan biosynthesis by dermal fibroblasts without activating cell proliferation.

Acknowledgements:

We are very grateful to the “Association nationale de la recherche et de la technologie”, for contributing to this work by providing a part of a PhD funding. We also thank the “Biomolécule High Resolution Analysis Platform” from the LIENSs Laboratory of La Rochelle University for the NMR and UHPLC-HRMS analyses.

B.4. Discussion générale

Cette étude, constituée de deux parties concerne l'activité dermo-cosméceutique anti-âge potentielle de différentes fractions extraites de macroalgues.

Dans la première partie de ce travail, nous avons, dans un premier temps, évalué le potentiel d'une dizaine d'extraits aqueux de macroalgues pour leur capacité à activer la biosynthèse de collagène par des fibroblastes dermiques humains. Les macroalgues testées font partie des trois grandes classes : *Himanthalia elongata*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Saccharina latissima*, *Undaria pinnatifida* pour les macroalgues brunes, *Chondrus crispus* pour les macroalgues rouges et *Ulva intestinalis* et *Ulva lactuca* pour les macroalgues vertes.

La biosynthèse du collagène a été mesurée par le test au Sirius red. Le sirius red est utilisé depuis de nombreuses années afin de quantifier le collagène dans les tissus (Jones et al. 2013). Cette méthode est basée sur le fait que le sirius red, en solution dans une solution saturée d'acide picrique, a la capacité de se lier sélectivement au collagène fibrillaire (I et IV) (Figure 32) et que le mécanisme de liaison fait intervenir une interaction acide entre le colorant et l'acide aminé présent dans le collagène (Gly-X-Y).

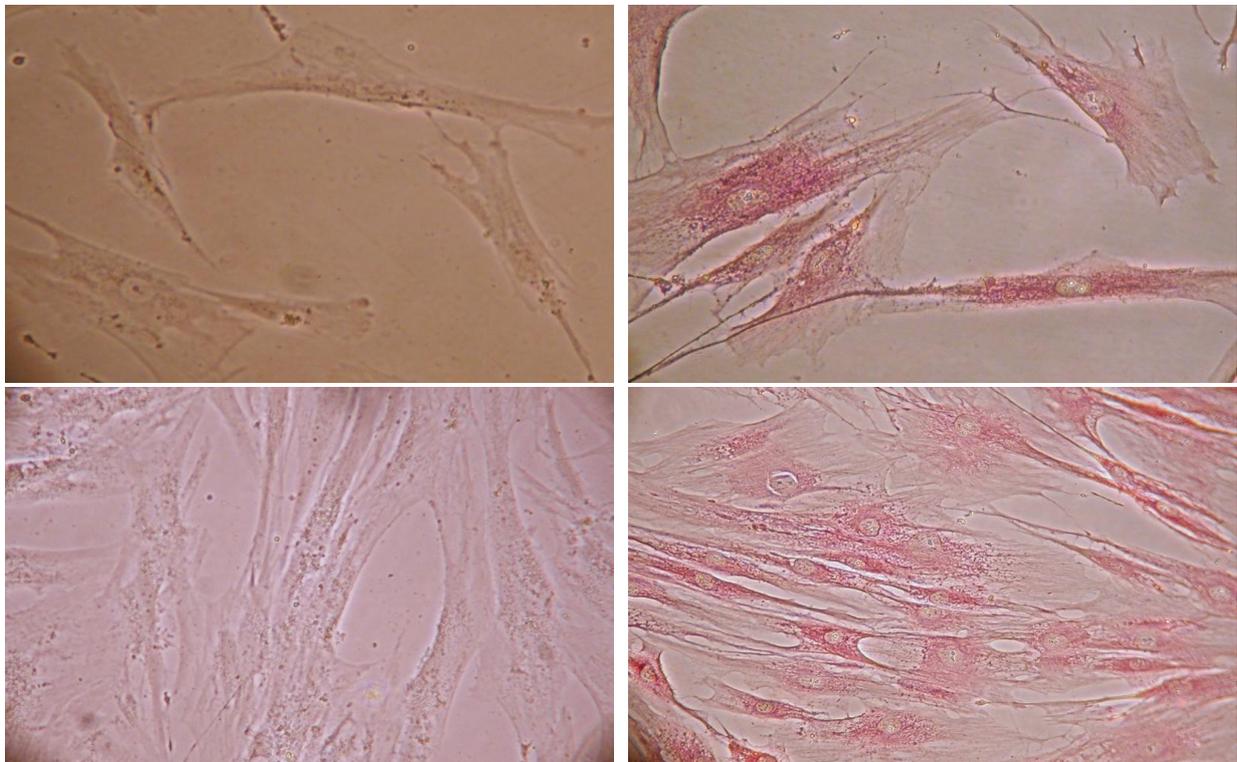


Figure 32. Culture *in vitro* de fibroblastes dermiques humains avant (gauche) et après (droite) coloration du collagène au Sirius Red.

Des extraits aqueux au potentiel de stimulation de collagène différents

Cette partie a mis en évidence le potentiel de trois extraits aqueux de macroalgues pour la stimulation de la production de collagène par les fibroblastes dermiques : *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Ulva intestinalis*. Les extraits aqueux étant complexes, nous avons décidé, dans un deuxième temps, de réaliser une première séparation par précipitations successives des deux types de biomolécules majoritaires des extraits, c'est-à-dire les protéines (fractions PR) et les polysaccharides (fractions PS), afin de cibler la ou les fraction(s) à l'origine de l'activité observée pour les extraits aqueux.

Tous les extraits aqueux testés à 1 mg.mL^{-1} dans la première partie ont un impact sur la vitesse de croissance des fibroblastes. En effet, la croissance est ralentie, en particulier pour les extraits aqueux d'*Ulva intestinalis*, et *Saccharina latissima* qui engendrent respectivement une diminution du nombre de cellules par rapport au témoin négatif de 75 et 50%. Ces trois algues sont les plus riches en polysaccharides. Pour la plupart des autres extraits, la diminution du nombre de cellules par rapport au témoin négatif est de 30 à 40%. Dans les puits traités avec les différents extraits à 1 mg.mL^{-1} , trois extraits sortent particulièrement du lot pour leur capacité à agir comme stimulant de la production de collagène. En effet, dans les puits traités avec les extraits aqueux produits à partir de *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Ulva intestinalis* la production de collagène augmente respectivement de 43, 39 et 31% par rapport au témoin négatif. Les deux extraits d'*Ulva lactuca* et de *Chondrus crispus* augmentent la production de 15% environ. Au contraire, dans les puits traités avec les extraits de *Himanthalia elongata*, *Saccharina latissima* et *Laminaria digitata*, la production de collagène est plus faible que celle du témoin négatif.

Cependant, il est intéressant de discuter des résultats concernant la production de collagène par cellule et non plus par puits. En effet, nous avons montré précédemment que les extraits aqueux avaient un impact négatif sur la vitesse de croissance cellulaire par rapport au témoin négatif, la production de collagène observée dans les puits correspond donc à une production pour un nombre plus faible de cellules. Ainsi, pour chaque extrait aqueux, nous observons une stimulation de la quantité de collagène produite par cellule individuelle par rapport au témoin négatif d'au moins 50%. L'augmentation la plus spectaculaire concerne les fibroblastes traités avec l'extrait d'*Ulva intestinalis*, qui produisent en moyenne 400% de collagène en plus par cellule que les cellules sans traitement.

Ce résultat est important car il apporte des informations sur le mode de stimulation des extraits. En effet, il est clair que dans notre cas, la stimulation des extraits aqueux correspond à une stimulation de la production de chaque cellule et non à une augmentation de la production de collagène liée à une augmentation de la densité de cellules, comme c'est le cas pour les stimulants conventionnels. En effet, l'effet stimulant de molécules comme l'acide ascorbique ou le facteur de croissance TGF- β porte majoritairement sur l'augmentation de la prolifération cellulaire et non l'augmentation de la production de collagène par cellule (Jones et al. 2013). Nous avons émis l'hypothèse que ces extraits étaient à l'origine d'une

modification du métabolisme des fibroblastes, réorienté vers une production accrue de collagène au détriment de la croissance cellulaire.

Les fractions protéiques responsables de la stimulation de production du collagène

Les trois extraits aqueux des macroalgues *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum* et *Ulva intestinalis* sont des extraits complexes, composés en grande majorité de deux types de biomolécules : des polysaccharides et des protéines. Les extraits de *Fucus* et *Ascophyllum* sont particulièrement riches en protéines, avec respectivement 39.5 et 54% de protéines et 28% et 35% de polysaccharides. L'extrait d'*Ulva intestinalis* est plus riche en polysaccharides, environ 39% de son poids sec, et possède 9.4% de protéines. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons réalisé deux précipitations successives, afin de précipiter une fraction riche en protéines (appelée fraction PR) et une autre riche en polysaccharides (appelée fraction PS).

Le premier résultat majeur qui ressort de cette étude est l'identification de la fraction PR, qui contient entre 62 et 68% de protéines selon l'extrait, en tant que fraction de loin la plus active sur la production de collagène, par rapport à la fraction PS. En effet, dans les puits traités avec les fractions PS précipitées à partir d'*Ascophyllum* (A-PS), de *Fucus* (F-PS) et d'*Ulva* (U-PS), la quantité de collagène produite est inférieure ou égale à celle du témoin négatif, même à 1 mg.mL^{-1} . La production par cellule augmente toutefois, en particulier pour A-PS, mais dans des mesures non comparables à celles observées pour la fraction PR et surtout, cette activité est perdue à 0.1 mg.mL^{-1} .

Ce manque d'activité des fractions riches en polysaccharides, et particulièrement de F-PS et A-PS, qui sont riches en fucoïdanes, ne va pas dans le sens de certains travaux qui ont démontré l'activité de polysaccharides sulfatés et surtout des fucoïdanes, comme stimulants de la synthèse de collagène par des fibroblastes (Moon et al. 2009). En effet, l'étude de Moon a montré que des fucoïdanes étaient capables d'inhiber l'expression de la MMP-1 *in vitro* par la suppression des kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK), inhibant la régulation à la baisse de la synthèse de procollagène I. De plus, dans les cellules traitées par des fucoïdanes, l'étude a montré que l'expression de l'ARNm de MMP-1 était significativement réduite. D'autres polysaccharides sulfatés ont également montré des capacités à stimuler la production de collagène, comme des galactanes sulfatés isolés de la macroalgue brune *Saccharina longicuris* et soumis à une dépolymérisation radicalaire, ayant la capacité de modifier la croissance cellulaire de fibroblastes ainsi que la synthèse de MMPs et de collagène de type I (Rioux et al. 2013). Dans cette étude, les galactofucanes bruts et dépolymérisés influencent la croissance des fibroblastes, l'apoptose et la synthèse des MMPs et du collagène en fonction de leur poids moléculaire.

Dans notre travail, la fraction PR riche en protéines présente des résultats différents. Dans les puits traités avec A-PR, F-PR et U-PR, la production de collagène augmente par rapport au témoin négatif pour les trois fractions à 1 et 0.1 mg.mL^{-1} .

La fraction U-PR à 0,1 et 1 mg.mL⁻¹ augmente la production de collagène dans les puits, respectivement de 21 et 37% par rapport au témoin négatif. Par contre, cette fraction diminue fortement la vitesse de croissance cellulaire par rapport aux fractions A-PR et F-PR. La production par cellule augmente de manière très importante lorsque celles-ci sont traitées avec U-PS à 1 mg.mL⁻¹, avec une augmentation de 400% par rapport au témoin négatif.

L'extrait A-PR présente un effet différent. En effet, la diminution de la vitesse de croissance des cellules traitées avec A-PR est limitée, de 20 à 40% selon la concentration de l'extrait. Dans les puits traités avec A-PR, la production de collagène est fortement stimulée par rapport au témoin négatif, et ce même à 0.01 mg.mL⁻¹, puisque la quantité de collagène produite par puits augmente respectivement de 49, 66 et 100% pour les fractions à 0.01, 0.1 et 1 mg.mL⁻¹. Cet extrait protéique est donc particulièrement intéressant, puisqu'il présente un effet négatif limité sur la vitesse de croissance des fibroblastes, tout en induisant une augmentation très significative de la production de collagène par les fibroblastes traités.

Aujourd'hui, certains produits cosméceutiques contenant des extraits riches en protéines d'origine algale, notamment de microalgues, sont déjà commercialisés. Un extrait d'*Arthrospira* (cyanobactérie, parfois appelée microalgue bleue) par exemple, riche en protéines, est utilisé pour ses propriétés de réparation des signes de vieillissement de la peau, de lutte contre les rides (Protulines[®], Exsymol S.A.M., Monaco). Un autre extrait protéique, produit à partir de *Chlorella vulgaris* (microalgue verte), stimule la synthèse de collagène dans la peau aidant ainsi la régénération des tissus et la réduction des rides (Dermochlorella[®], Codif, St. Malo, France).

Dans la deuxième partie, des ulvanes bruts ont été extraits par le procédé breveté développé par la société SEPROSYS (procédé SEPROSYS[®]). Ce procédé, permettant d'obtenir l'extrait ULVAN-01, d'un poids moléculaire moyen de 56 kDa et de pureté élevée, autour de 87%, ne fait intervenir ni solvant, ni acide libre, ce qui est un avantage dans le contexte actuel d'une expansion des pratiques de chimie « verte », aujourd'hui de plus en plus plébiscitées par les consommateurs des produits cosmétiques et cosméceutiques.

La prolifération cellulaire des fibroblastes influencée par la masse moléculaire des ulvanes

Afin de modifier les activités biologiques d'ULVAN-01, il peut être intéressant de modifier sa masse moléculaire. Pour cela, différentes techniques de dépolymérisation peuvent-être envisagées ; des techniques physiques, chimiques ou enzymatiques. Pour l'entreprise SEPROSYS, l'idéal est d'utiliser une méthode chimique, moins couteuse et adaptée à la technologie de l'entreprise. La dépolymérisation chimique par acide libre est une technique classique de dépolymérisation, mais, pour l'entreprise, la méthode la plus adaptée est la dépolymérisation chimique par résine d'échange d'ions. En effet, SEPROSYS est spécialisée dans ce domaine et possède l'équipement et l'expertise nécessaires. De plus, cette technique peut être facilement intégrée directement dans le procédé de purification des ulvanes développé par la société. C'est pourquoi nous avons décidé de soumettre ULVAN-01

à une dépolymérisation par résine d'échange d'ions afin d'obtenir ULVAN-DEP, un extrait d'ulvanes de faible poids moléculaire de degré, environ 4kDa, et d'étudier l'impact de la dépolymérisation de ces ulvanes sur la croissance cellulaire et la production de collagène et d'acide hyaluronique de fibroblastes dermiques humains.

Nous avons tout d'abord montré que ULVAN-01 diminue la vitesse de croissance des fibroblastes traités, au contraire du témoin positif, le TGF- β qui présente la capacité de stimuler la croissance de ces cellules. L'ulvane dépolymérisé ULVAN-DEP a par contre un effet très limité sur la croissance des cellules puisque l'on a observé une diminution très faible du nombre de cellules par rapport au témoin négatif, de 17% à la concentration testée la plus élevée de 0,5 mg.mL⁻¹ (contre 50% pour ULVAN-01). Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études ayant montré que la masse moléculaire des polysaccharides semble être un facteur prépondérant pour la croissance des fibroblastes. Des travaux réalisés sur des fucanes (Logeart et al. 1997) et galactofucanes (Rioux et al. 2013) ayant conclu que les polysaccharides de bas poids moléculaire (respectivement inférieurs à 8 kDa et 10kDa) n'avaient pas d'impact sur la croissance cellulaire. Au contraire, la même étude portant sur les galactofucanes a montré que les polysaccharides de plus hauts poids moléculaires (638 and 1529 kDa) réduisaient la croissance de fibroblastes humains. Si nos résultats sont concordants avec ces études précédentes, une autre étude a quant à elle montré que des polysaccharides bactériens riches en rhamnose possédant des masse moléculaires comprises entre 5 et 50 kDa avaient la capacité d'augmenter de manière très significative la croissance cellulaire (Andrès et al. 2006).

Une absence d'effet sur la production de collagène...

Dans cette étude, nous avons également montré que les ulvanes bruts ou dépolymérisés n'influençaient pas la biosynthèse du collagène dans les fibroblastes dermiques. Ces résultats concordent avec l'absence d'activité observée pour la fraction U-PS dans notre première partie ainsi qu'avec une étude précédente qui a analysé l'impact d'oligo- et polysaccharides riches en rhamnose sur la production de collagène par des fibroblastes dermiques (Rajoana et al. 2003). En effet, les résultats ont montré que des fibroblastes dermiques jeunes (7^{ème} passage) traités avec deux fractions de polysaccharides bactériens commerciaux riches en rhamnose et présentant des poids moléculaires de 50 et 5 kDa ne présentaient pas d'augmentation significative de leur production de collagène. Une augmentation de la production de collagène était observée seulement à partir du 12^{ème} passage pour les fibroblastes traités par les polysaccharides de bas poids moléculaire, les hauts poids moléculaires diminuant la production. Cependant, d'autres études ont conclu que des polysaccharides riches en rhamnose pouvaient stimuler la biosynthèse du collagène de fibroblastes en culture, montrant que ceux-ci possédaient des lectines capables de reconnaître le rhamnose (Andres et al. 2006, Faury et al. 2008). Cependant, cette étude a également conclu que toutes les fractions riches en rhamnose ne présentaient pas la même activité sur la production de collagène puisque deux polysaccharides de 50 et 45 kDa, riches en rhamnose mais contenant également du galactose et des acides glucuroniques mais et présentant des sous-

unités répétées différentes, n'avaient pas le même effet sur la production de collagène (Andres et al. 2006).

...mais un effet positif sur la stimulation de la production d'acide hyaluronique

Si ULVAN-01 et ULVAN-DEP ne présentent pas d'effet stimulant de la biosynthèse de collagène par les fibroblastes humains, les résultats concernant la production d'acide hyaluronique sont différents. En effet, dans les surnageants des cellules traitées avec ULVAN-01 et ULVAN-DEP, la concentration en acide hyaluronique est plus importante que celle du témoin négatif. Dans les puits traités avec ULVAN-01, il y a une augmentation dose-dépendante de la concentration en acide hyaluronique produite par les fibroblastes par rapport au témoin négatif. En effet, à 0,01, 0,1 et 0,5 mg.mL⁻¹, la concentration en acide hyaluronique dans les surnageant augmente respectivement de 5, 27 et 31% par rapport au contrôle négatif. La surproduction d'acide hyaluronique dans les puits est encore plus importante pour les fibroblastes traités avec ULVAN-DEP, avec une augmentation de 13, 46 et 35% par rapport au témoin négatif.

Notre étude montre également une considérable différence dans les concentrations produites individuellement par chaque cellule. Deux comportements très différents en ressortent. Tout d'abord le contrôle positif, (TGF- β) induit une augmentation de 56% de la concentration en acide hyaluronique par puits. Cependant, nous avons aussi montré que le TGF- β stimule fortement la croissance cellulaire, ce qui donne une production d'acide hyaluronique par cellule presque équivalente à celle du témoin négatif. Ce résultat montre que la surproduction d'acide hyaluronique dans les puits traités par ce stimulant conventionnel est principalement due à l'augmentation du nombre de cellules et non à l'augmentation de la production de la synthèse d'acide hyaluronique par cellule. Le profil de stimulation est différent pour ULVAN-01 et ULVAN-DEP. En effet, l'acide hyaluronique produit par cellule pour les fibroblastes traités avec ULVAN-01 est dose-dépendant. A 0,01, 0,1 et 0,5 mg.mL⁻¹ il induit respectivement une augmentation de 21, 98 et 157% par rapport au témoin négatif. Ce résultat est particulièrement intéressant car il suggère que, bien qu'ULVAN-01 diminue la vitesse de croissance cellulaire, ses effets sur la production d'acide hyaluronique sont si significatifs que, malgré la diminution du nombre de cellules, la concentration en acide hyaluronique produite par les fibroblastes est très largement supérieure à celle produite par les cellules non traitées et à celles traitées par le TGF- β . Après la dépolymérisation, la production par cellule pour les fibroblastes traités avec ULVAN-DEP à 0,01, 0,1 et 0,5 mg.mL⁻¹ augmente de 15, 50 et 63% par rapport au témoin négatif. Ces résultats sont très intéressants car ils sont associés à un effet sur la croissance cellulaire très limité.

Ainsi, pour nos extraits d'ulvanes, l'augmentation de la production d'acide hyaluronique est due à une stimulation de la synthèse d'acide hyaluronique et non une stimulation de la croissance cellulaire, contrairement aux stimulants conventionnels comme le TGF- β (Jones et al. 2013). De plus, les ulvanes présentent un intérêt supplémentaire puisqu'ils peuvent être facilement incorporés dans des formulations cosmétiques du fait de leur importante solubilité dans l'eau. Ils forment des solutions relativement non visqueuses dans

Résultats, partie B.4.

l'eau ou les solutions salines diluées, n'ajoutant ainsi pas de consistance à la formulation contrairement aux alginates ou agar par exemple (Agatonovic-Kustrin et Morton 2013).

Pour conclure sur cette partie B, différentes fractions, polysaccharidiques ou protéiques semblent présenter un fort intérêt pour leur activité sur la production de collagène ou d'acide hyaluronique. Cette étude ne nous permet pas de connaître le mécanisme à l'origine de cette stimulation de la production. Même si nous avons pu montrer que nos extraits avaient une action différente des stimulateurs conventionnels, qui stimulent la prolifération cellulaire plutôt que la production intrinsèque de la cellule, et donc la modification de son métabolisme en faveur d'une sur-production de collagène ou d'acide hyaluronique, il serait intéressant d'étudier si nos extraits agissent sur certains points clés liés au vieillissement de la peau comme, par exemple, l'expression des MMP.

Ces résultats sont intéressants pour l'entreprise SEPROSYS. Ils permettent en effet d'envisager la valorisation de deux fractions différentes pouvant être récupérées par le procédé SEPROSYS[®]. De plus, le fait que le procédé d'extraction et de purification respecte les pratiques de la chimie verte, est un avantage non négligeable dans l'optique de la valorisation de ces fractions, puisque les produits naturels et extraits par des procédés respectueux de l'environnement sont de plus en plus demandés par les consommateurs de dermo-cosméceutiques.

Conclusion :

- Tous les extraits aqueux testés diminuent de manière plus ou moins marquée la vitesse de croissance des fibroblastes dermiques humains.
- Sur la dizaine d'extraits aqueux testés comme stimulants de la production de collagène par des fibroblastes humains, trois présentent des effets particulièrement intéressants : *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Ulva intestinalis*.
- C'est la fraction riche en protéines qui est à l'origine de la forte activité observée sur la production de collagène pour les fibroblastes dermiques humains tandis que la fraction riche en polysaccharides ne présente pas d'effet significatif.
- Les fractions protéiques présentent une activité différente des stimulants classiques comme le TGF- β pour lesquels l'augmentation de la production de collagène est principalement due à la stimulation de la croissance des fibroblastes et non pas à la stimulation de la production de collagène par cellule. Au contraire, pour les extraits protéiques, l'augmentation de la production de collagène par cellule par rapport au témoin négatif est très significative.
- L'extrait protéique d'*Ulva intestinalis* est à l'origine d'une très forte sur-production de collagène par cellule individuelle mais également d'une diminution très significative de la vitesse de croissance des fibroblastes
- L'extrait protéique d'*Ascophyllum nodosum* est particulièrement intéressant car son effet sur la croissance des fibroblastes est limité et il provoque une forte augmentation de la production de collagène.
- Ces résultats pourraient permettre à SEPROSYS d'augmenter la valorisation de leur procédé en récupérant la fraction protéique purifiée lors de leur procédé d'extraction.

- Le procédé de dépolymérisation par résine d'échange d'ions développé dans notre travail permet d'obtenir des ulvanes de poids moléculaires moyen donnés et est facilement applicable par SEPROSYS, compte-tenu de son savoir-faire et de ses équipements.
- La croissance des fibroblastes traités par l'extrait d'ulvane brut est diminuée tandis que l'impact de l'extrait d'ulvane de bas poids moléculaire est très limité.
- Les ulvanes dépolymérisés ou non ne présentent pas d'effet stimulant significatif sur la production du collagène par les fibroblastes dermiques humains
- Les ulvanes présentent une activité différente du TGF- β , pour lequel l'augmentation de la production d'acide hyaluronique est principalement due à la stimulation de la croissance des fibroblastes et pas à la stimulation de la production d'acide hyaluronique par cellule. Au contraire, les ulvanes stimulent la synthèse d'acide hyaluronique par cellule de manière très significative.
- La fraction polysaccharidique purifiée par le procédé SEPROSYS pourrait trouver des applications en dermo-cosmétique.

IV. Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'intègrent dans un projet dont la finalité est de **valoriser un procédé d'extraction fractionnée et de purification de molécules issues de macroalgues marines**. Ce procédé, développé par la société SEPROSYS, permet en particulier l'extraction et la purification des polysaccharides sulfatés de macroalgues, biomolécules dont divers travaux de la littérature ont démontré l'intérêt dans les domaines de la pharmaceutique, nutraceutique ou bien cosmétique. Différentes études ont par exemple mis en évidence l'intérêt des polysaccharides sulfatés pour leurs activités anticoagulantes (Carlucci et al. 1997; Chevotot et al. 1999; Matsubara 2004; Majdoub et al. 2009; Jin et al. 2013; S.-K. Kim et Wijesekara 2011), immuno-inflammatoires (Granert et al. 1994; Jiao et al. 2011; Mohamed, Hashim, et Rahman 2012), antivirales (Damonte, Matulewicz, et Cerezo 2004; Jiao et al. 2011; Pujol et al. 2012; Rabanal et al. 2014; Witvrouw et De Clercq 1997) ou anti-oxydantes (Pilar Rupérez, Ahrazem, et Leal 2002; Rocha de Souza et al. 2007; L. S. Costa et al. 2010).

L'objectif de ce travail de thèse était alors d'étudier le potentiel de **polysaccharides sulfatés extraits** de macroalgues vertes, rouges et brunes, au-travers de deux voies de valorisation : une première à visée pharmaceutique, l'activité **anti-coagulante**, et une seconde à visée dermo-cosmétique, l'activité **anti-âge**.

Nos travaux ont permis de :

- a) développer nos connaissances sur la **composition biochimique** et la **structure** des polysaccharides sulfatés extraits par le procédé SEPROSYS[®] ;
- b) développer une méthode de **dépolymérisation** de ces polysaccharides sulfatés par résine échangeuse d'ions facilement transposable à l'échelle industrielle, compte-tenu du savoir-faire et des équipements de l'entreprise ;
- c) identifier des **activités biologiques** liées aux deux voies de valorisation choisies pour les polysaccharides sulfatés extraits de macroalgues, et en particulier d'*Ulva sp.*, permettant d'imaginer une valorisation industrielle de ces biomolécules et ;
- d) identifier une activité anti-âge particulièrement intéressante d'extraits riches en **protéines** issus de certaines macroalgues, permettant d'envisager en **perspective de développement futur** la valorisation de la fraction protéique extraite lors du procédé SEPROSYS[®].

La partie A de notre travail a porté sur le **potentiel anti-coagulant** d'extraits de macroalgues plus ou moins purifiés, riches en polysaccharides sulfatés. Dans un premier temps (chapitre A.2.), des **extraits aqueux** de différentes macroalgues ont été préparés afin de cribler les macroalgues présentant le potentiel anti-coagulant le plus intéressant. Les macroalgues choisies sont des macroalgues appartenant aux trois grandes catégories de macroalgues, communes sur les côtes françaises (en particulier atlantique) : *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Himanthalia digitata*, *Fucus vesiculosus* pour les

Conclusion générale et perspectives

macroalgues brunes, *Chondrus crispus* pour les macroalgues rouges et *Ulva lactuca* pour les macroalgues vertes. L'activité de ces extraits a été comparée à celle de deux anti-coagulants commerciaux : une héparine non fractionnée (HNF) et une héparine de bas poids moléculaire (HBPM), le Lovenox[®].

Après avoir déterminé la composition biochimique des extraits aqueux, leur activité anti-coagulante a été évaluée par deux types de tests : un test enzymatique ciblant l'activité des extraits sur les deux enzymes centrales de la coagulation, le facteur Xa et la thrombine (facteur IIa), et des tests de coagulométrie qui évaluent l'activité des extraits sur les trois voies de la coagulation *in vitro*. Nos travaux ont révélé tout d'abord que l'extraction aqueuse à chaud aboutit à une **co-extraction** de protéines et polysaccharides dans des proportions différentes selon les extraits. Le premier résultat remarquable en termes d'activité anti-coagulante est qu'aucun de nos extraits ne présente d'activité anti-Xa ou anti-IIa en absence d'antithrombine (ATIII), inhibiteur naturel de la coagulation. En revanche, la plupart des extraits présentent une activité anti-Xa et anti-IIa antithrombine-dépendante, tout comme l'HNF et le Lovenox[®], mais dans des gammes de concentrations actives bien plus élevées, avec par exemple un facteur supérieur à 500 séparant l'activité anti-Xa de l'HNF de celle de l'extrait d'*Ascophyllum nodosum*, pourtant le plus actif des extraits testés. Nous avons également montré que les extraits aqueux de macroalgues agissent principalement sur la **voie intrinsèque** de la coagulation, trois macroalgues sortant particulièrement du lot : *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* et *Chondrus crispus*. En effet, un facteur 5 en concentration sépare seulement l'activité de ces extraits aqueux de celle de l'HNF.

Nous avons ainsi décidé de conserver pour la suite de notre étude les macroalgues *Laminaria digitata* et *Chondrus crispus* afin de les soumettre au **procédé SEPROSYS[®]** et extraire et purifier leurs polysaccharides sulfatés, c'est-à-dire respectivement des fucanes sulfatés et des carraghénanes (galactanes sulfatés). Bien que l'extrait d'*Ulva lactuca* n'ait pas démontré d'activité anti-coagulante intéressante, il nous a paru pertinent de continuer à étudier les Ulvales, macroalgues vertes du genre *Ulva*, pour la suite de l'étude, et ce pour différentes raisons : tout d'abord car très peu de travaux décrivent aujourd'hui l'activité anti-coagulante des polysaccharides sulfatés extraits de macroalgues vertes et en particulier d'**ulvanes** (rhamno-uronanes sulfatés extraits d'Ulvales) et très peu de détails sont connus sur la relation structure/fonction anti-coagulante de ces polysaccharides sulfatés originaux. De plus, la valorisation d'*Ulva sp.* représentait un objectif majeur de l'entreprise SEPROSYS, qui disposait dès l'initiation de ce projet de thèse d'un fournisseur d'*Ulva sp.* sur l'Ile d'Oléron.

Dans le chapitre A.3.1. de notre étude sur le potentiel anti-coagulant des polysaccharides sulfatés de macroalgues, nous avons donc soumis les trois algues choisies au **procédé SEPROSYS[®]**. La première observation que nous avons pu faire était que le procédé développé par la société n'était pas adapté en l'état à l'extraction de carraghénanes de *Chondrus crispus*. En effet, le fort pouvoir gélifiant de ces polysaccharides a rendu impossible le passage de l'extrait sur les résines échangeuses d'ions, l'une des étapes principales de ce procédé. Au contraire, le procédé a permis d'obtenir à partir d'*Ulva sp.* et *Laminaria digitata* des extraits de polysaccharides sulfatés de **pureté très élevée** (autour de

Conclusion générale et perspectives

87%), respectivement nommés ULVAN-01 et LAMI-01, avec des **rendements d'extraction de 8-10% par rapport au poids sec de l'algue dessalée**. Il faut toutefois noter que l'extraction des polysaccharides sulfatés de *Laminaria digitata* a nécessité d'adapter le procédé SEPROSYS® en ajoutant une étape de précipitation des alginates par un acide dilué. ULVAN-01 présente un poids moléculaire moyen de **56 kDa** et une proportion en **acides uroniques** assez élevée de **34%**, ainsi qu'un taux de sulfates de **11%**. LAMI-01 présente quant à lui un poids moléculaire moyen de **45 kDa** mais avec un **indice de polydispersité** assez élevé, caractérisant une hétérogénéité en masse importante, particulièrement due au fait qu'il contient beaucoup plus de polysaccharides sulfatés de petite taille qu'ULVAN-01. LAMI-01 est constitué de **73% de sucres neutres**, **17% d'acides uroniques** et **4,5% de sulfates**.

L'étude de l'activité anti-coagulante d'ULVAN-01 et LAMI-01 a révélé que celle-ci était inférieure à celle des extraits aqueux préalablement testés ou de fucoïdanes et ulvanes commerciaux. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce résultat tient dans la **diminution du poids moléculaire** des polysaccharides au cours du procédé. En effet, nous avons pu montrer grâce à des analyses d'HPLC en gel-perméation que le poids moléculaire moyen des extraits ULVAN-01 et LAMI-01 était inférieur à celui des polysaccharides sulfatés commerciaux. Par ailleurs, l'extraction par le procédé SEPROSYS® implique lors des étapes d'échange d'ions et de floculation des protéines des conditions relativement drastiques : la solution de polysaccharides est en effet acidifiée lors de l'échange d'ions pour atteindre une valeur de pH proche de 2 puis chauffée à 80°C pendant 2 heures afin de faire flocculer les protéines. Cette association acidité/température engendre très probablement une dépolymérisation partielle des polysaccharides à l'origine de la diminution de poids moléculaire moyen observée pour ULVAN-01 et LAMI-01. Cette hypothèse a par la suite été vérifiée en soumettant **ULVAN-01 à une dépolymérisation sur résine échangeuse d'ions**, qui a démontré que la dépolymérisation avait pour conséquence la perte de l'activité anti-coagulante initiale d'ULVAN-01.

L'un des résultats qui nous a particulièrement interpellés dans ce travail est la très faible activité anti-coagulante initiale d'ULVAN-01. En effet, bien que très peu de travaux de la littérature mettent en évidence le potentiel de rhamno-uronanes sulfatés en tant qu'anti-coagulants, une étude a démontré l'intérêt que pouvait présenter ce type de polysaccharides (W. Mao et al. 2006). En nous basant sur cette étude ainsi qu'à différents travaux de la littérature réalisés sur des fucoïdanes, nous avons émis l'hypothèse que cette faible activité pouvait être due à la **sulfatation relativement faible d'ULVAN-01**, proche de **11% contre 25 à 35%** pour les ulvanes extraits d'*Ulva conglobata* par Mao et al. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons chimiquement augmenté la sulfatation d'ULVAN-01, obtenant ainsi ULVAN-02, avant d'évaluer leurs activités anti-coagulantes. Ceci a fait l'objet de la dernière partie de cette étude sur l'activité anti-coagulante des polysaccharides sulfatés de macroalgues et a été valorisé par une demande de **brevet déposée en janvier 2016**.

Dans ces travaux (partie A.3.2), nous avons obtenu ULVAN-02 avec un rendement de 40% (en poids sec d'ULVAN-01), et un taux de sulfates de **20%**, doublant ainsi le taux initial présenté par ULVAN-01. De plus, aucune modification du poids moléculaire d'ULVAN-02

Conclusion générale et perspectives

n'a été observée par rapport à ULVAN-01. Nous avons par la suite montré, et ce pour la première fois à notre connaissance, que l'augmentation de la sulfatation d'un ulvane pouvait induire une très forte augmentation de son activité anti-coagulante, sur toutes les voies de la coagulation mais surtout sur les deux voies initiales de la cascade de coagulation *in vitro*, c'est-à-dire **les voies extrinsèque et intrinsèque**. En effet, sur la voie intrinsèque de la coagulation, ULVAN-02 est 100 fois plus actif que le Lovenox[®] et présente une concentration nécessaire au doublement du temps de coagulation du témoin négatif seulement 3 fois plus élevée que celle de l'HNF. De même, sur la voie extrinsèque, ULVAN-02 présente une activité très proche de celle de l'HNF, et même supérieure à celle du Lovenox[®]. Nous avons également montré pour la première fois que l'activité anti-coagulante de l'ulvane dépendait grandement de son **taux de sulfatation**, mais que d'autres paramètres tels que sa **poids moléculaire** ou la **position des sulfates sur le polysaccharide** pouvaient également l'influencer, dans son **intensité** mais également dans ses **cibles**. Par exemple, nous avons mis en évidence une forte activité d'ULVAN-02 sur la voie intrinsèque, ce qui est **une première pour un rhamno-uronane sulfaté**, ce type de polysaccharide étant **habituellement peu voire non actif sur cette voie de la coagulation**, et ce même avec des masses moléculaires et des taux de sulfates proches de ceux d'ULVAN-02. Cette différence de cible de l'activité anti-coagulante d'ULVAN-02 pourrait trouver son explication dans le motif de sulfatation, puisque la sulfatation chimique est à l'origine d'une sulfatation de la chaîne polysaccharidique très différente de ce qui peut être trouvé dans la nature. En effet, nous avons mis en évidence par UHPLC-MS/MS la non sélectivité de la méthode de sulfatation chimique qui génère des disaccharides GlcA-Rha comportant 1 à 4 sulfates, avec des zones très sulfatés et d'autres beaucoup moins. En moyenne, nous avons donc obtenu un ULVAN-02 avec 2 sulfates pour 3 disaccharides, ce qui est très différent d'ULVAN-01 qui présentait seulement 1 sulfate pour 3 disaccharides, majoritairement sur le rhamnose (rhamnose 3-O-sulfaté selon la littérature, Lahaye et al. 2007). Pour finir, nous avons aussi montré que la cytotoxicité d'ULVAN-02 sur des fibroblastes dermiques humains était **faible et similaire à celle de l'HNF**, ce qui permet d'envisager son application et donc en premier lieu son développement à l'échelle pilote.

Ces travaux sur l'activité anti-coagulante des ulvanes présentent un intérêt particulier car il s'agit, à notre connaissance, des **premiers résultats publiés sur la relation structure/fonction de ce type de polysaccharide en termes d'activité anti-coagulante**. Afin de compléter cette étude et améliorer notre compréhension de la relation structure/fonction, il serait intéressant désormais de déterminer de manière plus précise les niveaux de sulfatation atteints sur l'ensemble de la chaîne polysaccharidique au-cours du procédé chimique, puisque nous n'avons pour le moment pu mettre en évidence cette sulfatation qu'à l'échelle de l'unité disaccharidique de structure de l'ulvane.

Dans la partie B de notre travail, nous avons évalué le potentiel de valorisation de macroalgues en dermo-cosmétique, en particulier en termes d'activité anti-âge.

Tout d'abord, nous avons montré dans la partie B.2. que, parmi la dizaine d'extraits

Conclusion générale et perspectives

aqueux de macroalgues testés, trois retenaient particulièrement notre attention : *Ulva intestinalis*, *Fucus vesiculosus* et *Ascophyllum nodosum*. En effet, nous avons observé que la production de collagène par des fibroblastes dermiques humains traités avec ces trois extraits aqueux augmentait de manière significative par rapport au témoin négatif, respectivement de **30%**, **40%** et **43%**, et que ce phénomène était accompagné d'une diminution de la croissance cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse que ces extraits étaient à l'origine d'une modification du métabolisme des fibroblastes, réorienté vers une production accrue de collagène au détriment de la croissance cellulaire.

Afin d'identifier la classe de molécules actives, nous avons fractionné par précipitation les protéines et les polysaccharides de ces trois extraits aqueux. Nous avons obtenu de cette manière deux types de fractions : une fraction protéique composée de **63 à 68% de protéines** et une fraction polysaccharidique composée de **50 à 75% de polysaccharides**, que nous avons testées sur les fibroblastes. Nous avons ainsi mis en évidence que **les fractions protéiques** étaient à l'origine de l'activité observée. En effet, tandis que les fractions polysaccharidiques n'ont pas montré d'effet significatif sur la production de collagène par les fibroblastes, les résultats étaient très différents pour les cellules traitées avec les fractions protéiques. Nous avons observé une **forte augmentation dose-réponse de la production de collagène** par les cellules traitées avec ces fractions. Un autre point qui est ressorti de notre étude était la différence de comportement entre la fraction protéique d'*Ulva intestinalis* et celle d'*Ascophyllum nodosum*. En effet, nous avons observé une diminution importante de la croissance des cellules traitées avec la fraction protéique d'*Ulva intestinalis* par rapport au témoin négatif, respectivement de 20, 55 et 70% à 0,01, 0,1 et 1 mg/mL, ce qui n'était pas le cas pour la fraction d'*Ascophyllum nodosum*, qui a montré un impact très limité sur la croissance des fibroblastes avec une diminution respective du nombre de cellules par rapport au témoin négatif de 20, 30 et 40% à 0,01, 0,1 et 1 mg/mL. Ainsi, même si la fraction protéique d'*Ulva intestinalis* présente des résultats intéressants, en particulier pour la production de collagène par cellule (presque 400% d'augmentation par rapport au témoin négatif à 1 mg/mL et 150% à 0,1 mg/mL), c'est la fraction protéique d'*Ascophyllum nodosum* qui sort réellement du lot, alliant **forte augmentation de la bio-synthèse de collagène et impact limité** sur la croissance des cellules. En effet, dans les puits traités avec l'extrait protéique d'*Ascophyllum nodosum*, la production de collagène augmente respectivement de **100%**, **70%** et **50%** à 1 mg/mL, 0,1 mg/mL et 0,01 mg/mL, par rapport au témoin négatif (ces valeurs étant encore supérieures pour la production de collagène par cellule).

Ces résultats sont particulièrement intéressants car ils se **distinguent** de ce qui est observé pour les stimulants classiques de la production de collagène par les fibroblastes, tels que l'acide ascorbique ou le TGF- β , pour lesquels l'augmentation de la production est due en grande majorité à la **stimulation de la croissance cellulaire plutôt qu'à une augmentation de la bio-synthèse du collagène par cellule** individuelle. De plus, ils permettent d'envisager une nouvelle perspective de valorisation du procédé de l'entreprise SEPROSYS, qui permet de générer une fraction protéique.

Conclusion générale et perspectives

Dans le chapitre B.3., nous avons évalué le potentiel des ulvanes ULVAN-01 extraits par le procédé SEPROSYS[®] ainsi que l'impact de leur **poids moléculaire** sur la bio-synthèse de **l'acide hyaluronique et du collagène** par des fibroblastes dermiques humains. Pour cela, nous avons soumis ULVAN-01, polysaccharide d'environ 57 kDa, à une dépolymérisation sur résine permettant d'obtenir un ulvane de faible poids moléculaire, **ULVAN-DEP**, d'environ **4kDa**.

Nous avons tout d'abord démontré que le poids moléculaire de l'ulvane testé avait un impact sur la croissance des fibroblastes. En effet, ULVAN-01 était à l'origine d'une **réduction de la vitesse de croissance** des fibroblastes tandis qu'ULVAN-DEP avait un impact très **limité**. En effet, avec le traitement par ULVAN-01, le nombre de cellules était inférieur de **15, 40 et 50%** par rapport au témoin négatif pour des concentrations respectives de 0,01, 0,1 et 0,5 mg/mL contre **moins de 20%** à 0,5 mg/mL à **5%** à 0,01 mg/mL pour ULVAN-DEP. Au contraire, le traitement avec le contrôle positif, le facteur de croissance TGF- β , était à l'origine d'une **augmentation du nombre de fibroblastes**.

Si ULVAN-01 et ULVAN-DEP n'ont pas eu d'impact sur la production du collagène par les fibroblastes, les résultats concernant la bio-synthèse d'acide hyaluronique sont très différents. En effet, nous avons observé, dans les surnageants des cellules traitées avec les deux types d'ulvanes une **augmentation dose-réponse significative de la concentration en acide hyaluronique** par rapport au témoin négatif. Notre étude a également montré une considérable différence entre les causes de l'augmentation de cette production entre les cellules traitées par les ulvanes et celles traitées par le TGF- β , stimulant conventionnel. En effet, la sur-production d'acide hyaluronique dans les puits traités avec le TGF- β était principalement due à une **stimulation de la croissance cellulaire, au contraire des ulvanes qui stimulaient directement la production par cellule**. En effet, si la quantité d'acide hyaluronique augmente de presque 60% dans les puits traités avec le TGF- β par rapport au témoin négatif, la quantité d'acide hyaluronique produite par cellule est quasiment identique à celle des cellules non traitées. Au contraire, la production par cellule pour les fibroblastes traités avec ULVAN-DEP et ULVAN-01 augmente respectivement de plus de 150% et 60% à 1 mg/mL. Les résultats obtenus pour **ULVAN-DEP** sont particulièrement intéressants car il est à l'origine d'une **augmentation significative de la production d'acide hyaluronique par les cellules tout en ayant un impact très limité sur la croissance des fibroblastes**. Par exemple, dans les puits traités avec ULVAN-DEP à 0,1 mg/mL, la quantité d'acide hyaluronique produite augmente de presque **50%** par rapport au témoin négatif alors que le nombre de cellules y est inférieur de seulement **5%**.

Perspectives

A ce stade du projet, nous avons tout d'abord mis en évidence **deux types de valorisation possibles des polysaccharides sulfatés extraits de l'*Ulva sp.* cultivée à la ferme du Douhet, sur l'île d'Oléron** : tout d'abord en pharmaceutique puisqu'un ulvane extrait par le procédé SEPROSYS[®], ULVAN-01, puis sulfaté par méthode chimique pour

Conclusion générale et perspectives

obtenir ULVAN-02, a présenté une activité anti-coagulante majeure associée à une cytotoxicité limitée, démontrée sur des fibroblastes ; puis, en dermo-cométique pour l'effet stimulant sur la bio-synthèse d'acide hyaluronique par des fibroblastes dermiques humains normaux, démontré pour ULVAN-01 et un ulvane dépolymérisé produit à partir d'ULVAN-01, ULVAN-DEP.

Nous avons également mis en évidence le grand intérêt de la fraction protéique de certaines des macroalgues testées, notamment *Ulva intestinalis*, *Fucus vesiculosus* et *Ascophyllum nodosum*, comme stimulants de la production de collagène par les fibroblastes *in vitro*. Ces résultats permettent donc d'envisager des perspectives prometteuses pour une nouvelle fraction issue du procédé SEPROSYS[®], **la fraction protéique**. Pour cela, il sera nécessaire **d'optimiser le procédé de fractionnement**, aujourd'hui plus tourné vers la purification des polysaccharides sulfatés, afin d'être en capacité de produire une fraction protéique avec un rendement et un degré de pureté transposables à l'échelle pilote et pourquoi pas à l'échelle industrielle.

Il pourra également être intéressant de **caractériser** de manière plus précise cette fraction protéique et de poursuivre la recherche sur son activité anti-âge, en cherchant notamment à **identifier les caractéristiques structurales (composition en acides aminés, poids moléculaire, interactions synergiques ou antagonistes, ...), ainsi que les cibles et les mécanismes** à l'origine de cette activité. Par exemple, des tests *in vitro* pour évaluer l'expression de la MMP-1, ou collagénase, pourraient être réalisés sur les fibroblastes traités ou non avec les extraits. De plus, il pourrait être envisageable de tester ces extraits, non plus sur des cellules dermiques cultivées en flasques *in vitro* mais sur des modèles 3D de peau.

En plus de cette activité anti-âge, d'autres activités biologiques pourraient être évaluées pour cette fraction protéique, après **hydrolyse enzymatique** notamment, par exemple pour des applications en nutraceutique de ces protéines ou peptides générés.

En optimisant le procédé SEPROYS[®], il pourrait également être possible d'obtenir d'autres fractions pouvant trouver des axes de valorisation comme les **sels minéraux**, utilisés notamment en cosmétique, les **pulpes**, ou même la **fraction pigmentaire**, qui pourrait présenter des applications anti-oxydante ou anti-tumorale.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

A

- Agatonovic-Kustrin, Snezana, et David W Morton. 2013. « Cosmeceuticals Derived from Bioactive Substances Found in Marine Algae ». *Oceanography: Open Access* 01 (02).
- Alban, S. 2002. « Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure–activity relationships of new pullulan sulfates ». *Carbohydrate Polymers* 47 (3): 267-76.
- Ale, Marcel Tutor, Jørn D. Mikkelsen, et Anne S. Meyer. 2011. « Important Determinants for Fucoïdan Bioactivity: A Critical Review of Structure–Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds ». *Marine Drugs* 9 (10): 2106-30.
- Alves, Anabela, Rui A. Sousa, et Rui L. Reis. 2013. « A Practical Perspective on Ulvan Extracted from Green Algae ». *Journal of Applied Phycology* 25 (2): 407-24.
- Amadeus Investigators, M. G. Bousser, J. Bouthier, H. R. Büller, A. T. Cohen, H. Crijns, B. L. Davidson, et al. 2008. « Comparison of Idraparinux with Vitamin K Antagonists for Prevention of Thromboembolism in Patients with Atrial Fibrillation: A Randomised, Open-Label, Non-Inferiority Trial ». *Lancet (London, England)* 371 (9609): 315-21.
- Andrès, E., J. Molinari, G. Péterszegi, B. Mariko, E. Ruzsova, V. Velebny, G. Faury, et L. Robert. 2006. « Pharmacological Properties of Rhamnose-Rich Polysaccharides, Potential Interest in Age-Dependent Alterations of Connective Tissues ». *Pathologie-Biologie* 54 (7): 420-25.
- Aneiros, A, et A Garateix. 2004. « Bioactive Peptides from Marine Sources: Pharmacological Properties and Isolation Procedures ». *Journal of Chromatography B* 803 (1): 41-53.
- ANSM. 2014. « Les anticoagulants en France en 2014: état des lieux, synthèse et surveillance ». ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé).
- Arasaki, Seibin, et Teruko Arasaki. 1983. *Low Calorie, High Nutrition Vegetables from the Sea to Help You Look and Feel Better*. Japan Publications.
- Armaganijan, Luciana, Dimpi Patel, Cristiano Dietrich, et Carlos A. Morillo. 2012. « Stroke Prevention in Atrial Fibrillation: Latest Clinical Trials and Guidelines ». *Pharmaceuticals* 5 (12): 384-97.
- Atkins, E. D. T., K. D. Parker, et R. D. Preston. 1969. « The Helical Structure of the Formula-1,3-Linked Xylan in Some Siphonous Green Algae ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 173 (1031): 209-21.

B

- Balboa, Elena M., Enma Conde, M. Luisa Soto, Lorena Pérez-Armada, et Herminia Domínguez. 2015. « Cosmetics from Marine Sources ». In *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, édité par Se-Kwon Kim, 1015-42. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Barbarino, Elisabete, et Sergio O. Lourenço. 2005. « An Evaluation of Methods for Extraction and Quantification of Protein from Marine Macro- and Microalgae ». *Journal of Applied Phycology* 17 (5): 447-60.
- Barros Gomes Camara, Rafael, Leandro Silva Costa, Gabriel Pereira Fidelis, Leonardo Thiago Duarte Barreto Nobre, Nednaldo Dantas-Santos, Sara Lima Cordeiro, Mariana Santana Santos Pereira Costa, Luciana Guimaraes Alves, et Hugo Alexandre Oliveira Rocha. 2011. « Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus Cervicornis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities ». *Marine Drugs* 9 (1): 124-38.
- Bedoux, Gilles, Kevin Hardouin, Anne Sophie Burlot, et Nathalie Bourgougnon. 2014. « Bioactive Components from Seaweeds ». In *Advances in Botanical Research*, 71:345-78. Elsevier.
- Bernstein, E. F., Y. Q. Chen, K. Tamai, K. J. Shepley, K. S. Resnik, H. Zhang, R. Tuan, A. Mauviel, et J. Uitto. 1994. « Enhanced Elastin and Fibrillin Gene Expression in Chronically Photodamaged Skin ». *The Journal of Investigative Dermatology* 103 (2): 182-86.

- Bernstein, E. F., L. W. Fisher, K. Li, R. G. LeBaron, E. M. Tan, et J. Uitto. 1995. « Differential Expression of the Versican and Decorin Genes in Photoaged and Sun-Protected Skin. Comparison by Immunohistochemical and Northern Analyses ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 72 (6): 662-69.
- Beylot, C., et L. Martin. 2007. « Maladies héréditaires du collagène et du tissu élastique ». *EMC - Dermatologie* 2 (3): 1-23.
- Bhatia, Saurabh, K Sharma, A Sharma, Arun Garg, S Kumar, et Ap Purohit. 2011. « Mycosporine and Mycosporine-like Amino Acids: A Paramount Tool against Ultra Violet Irradiation ». *Pharmacognosy Reviews* 5 (10): 138.
- Bilan, Maria I., Alexey A. Grachev, Alexander S. Shashkov, Nikolay E. Nifantiev, et Anatolii I. Usov. 2006. « Structure of a Fucoidan from the Brown Seaweed *Fucus Serratus* L. ». *Carbohydrate Research* 341 (2): 238-45.
- Bird, Gladys May, et Paul Haas. 1931. « On the nature of the cell wall constituents of *Laminaria* spp. Mannuronic acid ». *Biochem J.* 25: 403-11.
- Birkedal-Hansen, H. 1987. « Catabolism and Turnover of Collagens: Collagenases ». *Methods in Enzymology* 144: 140-71.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, et J. A. Engler. 1993. « Matrix Metalloproteinases: A Review ». *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 4 (2): 197-250.
- Bitter, T., et H. M. Muir. 1962. « A modified uronic acid carbazole reaction ». *Analytical Biochemistry* 4 (4): 330-34.
- Bixler, Harris J., et Hans Porse. 2011. « A Decade of Change in the Seaweed Hydrocolloids Industry ». *Journal of Applied Phycology* 23 (3): 321-35.
- Black, W. A. P. 1950. « The Seasonal Variation in Weight and Chemical Composition of the Common British Laminariaceae ». *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 29 (01): 45.
- Black, W. A. P., E. T. Dewar, et F. N. Woodward. 1952. « Manufacture of Algal Chemicals. IV—Laboratory-Scale Isolation of Fucoidin from Brown Marine Algae ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 3 (3): 122-29.
- Bogdanowicz, P., et D. Redoulès. 2012. « Mécanismes moléculaires du vieillissement cutané ». *Keratin*, n° 18: 6-12.
- Bouloc, Anne. 2001. « Les cellules dendritiques cutanées humaines ». *médecine/sciences*, n° 17: 465-74.
- Bourgougnon, Nathalie, Christos Roussakis, Jean-Michel Kornprobst, et Marc Lahaye. 1994. « Effects in Vitro of Sulfated Polysaccharide from *Schizymenia Dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales) on a Non-Small-Cell Bronchopulmonary Carcinoma Line (NSCLC-N6) ». *Cancer Letters* 85 (1): 87-92.
- Bradford, Marion M. 1976. « A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding ». *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-54.
- Brandt, Fredric S., Alex Cazzaniga, et Michael Hann. 2011. « Cosmeceuticals: Current Trends and Market Analysis ». *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 30 (3): 141-43.
- Braverman, I. M., et E. Fonferko. 1982. « Studies in Cutaneous Aging: I. The Elastic Fiber Network ». *The Journal of Investigative Dermatology* 78 (5): 434-43.
- Buchholz, C.M., G. Krause, et B.H. Buck. 2012. « Seaweed and man ». In *Seaweed biology: Novel insights into ecophysiology, ecology and utilization*, 219:471-93. Ecological studies. Wiencke C. and Bischof K.

C

- Campisi, J. 1996. « Replicative Senescence: An Old Lives' Tale? ». *Cell* 84 (4): 497-500.
- . 1997. « Aging and Cancer: The Double-Edged Sword of Replicative Senescence ». *Journal of the American Geriatrics Society* 45 (4): 482-88.
- Campo, Vanessa Leiria, Daniel Fábio Kawano, Dílson Braz da Silva, et Ivone Carvalho. 2009. « Carrageenans: Biological Properties, Chemical Modifications and Structural Analysis – A Review ». *Carbohydrate Polymers* 77 (2): 167-80.
- Cantarelli, Benoit. 2009. « Influence des peptides d'élastine sur l'apoptose des fibroblastes dermiques humains de sujets jeunes, matures et âgés ». Reims.

- Carlucci, M. J., C. A. Pujol, M. Ciancia, M. D. Nosedá, M. C. Matulewicz, E. B. Damonte, et A. S. Cerezo. 1997. « Antitherpetic and Anticoagulant Properties of Carrageenans from the Red Seaweed *Gigartina Skottsbergii* and Their Cyclized Derivatives: Correlation between Structure and Biological Activity ». *International Journal of Biological Macromolecules* 20 (2): 97-105.
- Carrino, D. A., J. M. Sorrell, et A. I. Caplan. 2000. « Age-Related Changes in the Proteoglycans of Human Skin ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373 (1): 91-101.
- Chandía, N. P., et B. Matsuhira. 2008. « Characterization of a Fucoidan from *Lessonia Vadosa* (Phaeophyta) and Its Anticoagulant and Elicitor Properties ». *International Journal of Biological Macromolecules* 42 (3): 235-40.
- Chapman, Valentine Jackson, et David J. Chapman. 1980. *Seaweeds and Their Uses*. 3. ed. London ; New York: Chapman and Hall.
- Chattopadhyay, Nabanita, Tuhin Ghosh, Sharmistha Sinha, Kausik Chattopadhyay, Paramita Karmakar, et Bimalendu Ray. 2010. « Polysaccharides from *Turbinaria Conoides*: Structural Features and Antioxidant Capacity ». *Food Chemistry* 118 (3): 823-29.
- Chen, Q., et B. N. Ames. 1994. « Senescence-like Growth Arrest Induced by Hydrogen Peroxide in Human Diploid Fibroblast F65 Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (10): 4130-34.
- Chevolot, L., A. Foucault, F. Chaubet, N. Kervarec, C. Siquin, A. M. Fisher, et C. Boisson-Vidal. 1999. « Further Data on the Structure of Brown Seaweed Fucans: Relationships with Anticoagulant Activity ». *Carbohydrate Research* 319 (1-4): 154-65.
- Chevolot, L., B. Mulloy, J. Ratiskol, A. Foucault, et S. Collic-Jouault. 2001. « A Disaccharide Repeat Unit Is the Major Structure in Fucoidans from Two Species of Brown Algae ». *Carbohydrate Research* 330 (4): 529-35.
- Church, F. C., J. B. Meade, R. E. Treanor, et H. C. Whinna. 1989. « Antithrombin Activity of Fucoidan. The Interaction of Fucoidan with Heparin Cofactor II, Antithrombin III, and Thrombin. ». *Journal of Biological Chemistry* 264 (6): 3618-23.
- Ciancia, Marina, Irene Quintana, María Isabel Vizcargüenaga, Luciana Kasulin, Agustina de Dios, José Manuel Estevez, et Alberto Saúl Cerezo. 2007. « Polysaccharides from the Green Seaweeds *Codium Fragile* and *C. Vermilara* with Controversial Effects on Hemostasis ». *International Journal of Biological Macromolecules* 41 (5): 641-49.
- Collic Jouault, S., L. Chevolot, D. Helley, J. Ratiskol, A. Bros, C. Siquin, O. Roger, et A. M. Fischer. 2001. « Characterization, Chemical Modifications and in Vitro Anticoagulant Properties of an Exopolysaccharide Produced by *Alteromonas Infernus* ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1528 (2-3): 141-51.
- Collic, S., A. M. Fischer, J. Tapon-Breaudiere, C. Boisson, P. Durand, et J. Jozefonvicz. 1991. « Anticoagulant Properties of a Fucoidan Fraction ». *Thrombosis Research* 64 (2): 143-54.
- Conde, F. R., M. S. Churio, et C. M. Previtali. 2000. « The Photoprotector Mechanism of Mycosporine-like Amino Acids. Excited-State Properties and Photostability of Porphyrin-334 in Aqueous Solution ». *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 56 (2-3): 139-44.
- Connan, Solène, Franck Delisle, Eric Deslandes, et Erwan Ar Gall. 2006. « Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters ». *Botanica Marina* 49 (1).
- Costa, Carina, Anabela Alves, Paula R. Pinto, Rui A. Sousa, Eduardo A. Borges da Silva, Rui L. Reis, et Alírio E. Rodrigues. 2012. « Characterization of Ulvan Extracts to Assess the Effect of Different Steps in the Extraction Procedure ». *Carbohydrate Polymers* 88 (2): 537-46.
- Costa, L. S., G. P. Fidelis, S. L. Cordeiro, R. M. Oliveira, D. A. Sabry, R. B. G. Câmara, L. T. D. B. Nobre, et al. 2010. « Biological Activities of Sulfated Polysaccharides from Tropical Seaweeds ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64 (1): 21-28.
- Costa, Mariana Santana Santos Pereira, Leandro Silva Costa, Sara Lima Cordeiro, Jailma Almeida-Lima, Nednaldo Dantas-Santos, Kaline Dantas Magalhães, Diego Araujo Sabry, et al. 2012. « Evaluating the Possible Anticoagulant and Antioxidant Effects of Sulfated Polysaccharides from the Tropical Green Alga *Caulerpa Cupressoides* Var. *Flabellata* ». *Journal of Applied Phycology* 24 (5): 1159-67.
- Creis, Emeline. 2015. « Etude de la voie de biosynthèse des phlorotannins chez les algues brunes, de la caractérisation biochimique d'enzymes recombinantes à l'étude des réponses physiologiques ». Laboratoire de biologie intégrative des modèles marins: Pierre et Marie Curie.
- Cristofalo, V. J., et R. J. Pignolo. 1993. « Replicative Senescence of Human Fibroblast-like Cells in Culture ». *Physiological Reviews* 73 (3): 617-38.

Cumashi, Albana, Natalia A. Ushakova, Marina E. Preobrazhenskaya, Armida D’Incecco, Antonio Piccoli, Licia Totani, Nicola Tinari, et al. 2007. « A Comparative Study of the Anti-Inflammatory, Anticoagulant, Antiangiogenic, and Antiadhesive Activities of Nine Different Fucoidans from Brown Seaweeds ». *Glycobiology* 17 (5): 541-52.

D

- Da Silva, Monica S., et Michael Sobel. 2002. « Anticoagulants: To Bleed or Not to Bleed, That Is the Question ». *Seminars in Vascular Surgery* 15 (4): 256-67.
- Daemi, Hamed, Mehdi Barikani, et Mohammad Barmar. 2013. « Compatible Compositions Based on Aqueous Polyurethane Dispersions and Sodium Alginate ». *Carbohydrate Polymers* 92 (1): 490-96.
- Damonte, Elsa B., María C. Matulewicz, et Alberto S. Cerezo. 2004. « Sulfated Seaweed Polysaccharides as Antiviral Agents ». *Current Medicinal Chemistry* 11 (18): 2399-2419.
- Davie, E. W., et O. D. Ratnoff. 1964. « Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting ». *Science (New York, N.Y.)* 145 (3638): 1310-12.
- Dawczynski, Christine, Rainer Schubert, et Gerhard Jahreis. 2007. « Amino Acids, Fatty Acids, and Dietary Fibre in Edible Seaweed Products ». *Food Chemistry* 103 (3): 891-99.
- De Reviere, B. 2003. *Biologie et phylogénie des algues*. Belin. Paris.
- Dias, Paulo Fernando, Jarbas Mota Siqueira, Luiz Felipe Vendruscolo, Teresinha de Jesus Neiva, Antônio Ricardo Gagliardi, Marcelo Maraschin, et Rosa Maria Ribeiro-do-Valle. 2005. « Antiangiogenic and Antitumoral Properties of a Polysaccharide Isolated from the Seaweed *Sargassum Stenophyllum* ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56 (4): 436-46.
- Dicker, Kevin T., Lisa A. Gurski, Swati Pradhan-Bhatt, Robert L. Witt, Mary C. Farach-Carson, et Xinqiao Jia. 2014. « Hyaluronan: A Simple Polysaccharide with Diverse Biological Functions ». *Acta Biomaterialia* 10 (4): 1558-70.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, et O. Pereira-Smith. 1995. « A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (20): 9363-67.
- Dobashi, K., T. Nishino, M. Fujihara, et T. Nagumo. 1989. « Isolation and Preliminary Characterization of Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides with Blood-Anticoagulant Activity from the Brown Seaweed *Hizikia Fusiforme* ». *Carbohydrate Research* 194 (décembre): 315-20.
- Donaldson, D. J., et J. T. Mahan. 1988. « Keratinocyte Migration and the Extracellular Matrix ». *The Journal of Investigative Dermatology* 90 (5): 623-28.
- Dréno, B. 2009. « Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 136 (octobre): S247-51.
- Drouet, Ludovic, et Laurent Ripoll. 2006. « Cibles des médicaments antithrombotiques ». *médecine/sciences* 22 (10): 887-94.
- Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, et F. Smith. 1951. « A Colorimetric Method for the Determination of Sugars ». *Nature* 168 (4265): 167.
- Dunlap, Walter C., et Yorihiro Yamamoto. 1995. « Small-Molecule Antioxidants in Marine Organisms: Antioxidant Activity of Mycosporine-Glycine ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 112 (1): 105-14.
- Dutot, Mélody, Roxane Fagon, Marc Hemon, et Patrice Rat. 2012. « Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Senescence Activities of a Phlorotannin-Rich Natural Extract from Brown Seaweed *Ascophyllum Nodosum* ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167 (8): 2234-40.

E

- Elalamy, I. 2010. « Héparines : structure, propriétés pharmacologiques et activités ». *EMC - Hématologie* 5 (3): 1-12.
- Elalamy, Ismail. 2007. « Cibles et mode d'action des nouveaux antithrombotiques ». *Médecine thérapeutique* 13: 89-101.
- Elias, Peter M., et Ruby Ghadially. 2002. « The Aged Epidermal Permeability Barrier: Basis for Functional Abnormalities ». *Clinics in Geriatric Medicine* 18 (1): 103-120, vii.
- Emanuele, R.M., et J. Fareed. 1987. « The Effect of Molecular Weight on the Bioavailability of Heparin ». *Thrombosis Research* 48 (5): 591-96.

F

- Faury, Gilles, E. Ruzsova, J. Molinari, B. Mariko, S. Raveaud, V. Velebny, et L. Robert. 2008. « The Alpha-L-Rhamnose Recognizing Lectin Site of Human Dermal Fibroblasts Functions as a Signal Transducer: Modulation of Ca²⁺ Fluxes and Gene Expression ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1780 (12): 1388-94.
- Fenske, N. A., et C. W. Lober. 1986. « Structural and Functional Changes of Normal Aging Skin ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 15 (4 Pt 1): 571-85.
- Filisetti-Cozzi, T. M., et N. C. Carpita. 1991. « Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars ». *Analytical Biochemistry* 197 (1): 157-62.
- Fischer, W., et M.-L. Bauchot. 1987. « Caractéristiques des algues "sensu stricto" ». In *Méditerranée et mer noire*, 1:28-31. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Rome: FAO.
- Fisher, G. J., Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, et J. J. Voorhees. 1997. « Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light ». *The New England Journal of Medicine* 337 (20): 1419-28.
- Fisher, Gary J., Taihao Quan, Trupta Purohit, Yuan Shao, Moon Kyun Cho, Tianyuan He, James Varani, Sewon Kang, et John J. Voorhees. 2009. « Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin ». *The American Journal of Pathology* 174 (1): 101-14.
- Fleurence, J. 2004. « Seaweed Proteins ». In *Proteins in Food Processing*, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition:197-213. Elsevier.
- Fleurence, Joël. 1999. « Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses ». *Trends in Food Science & Technology* 10 (1): 25-28.
- Fleurence, Joël, Estelle Chenard, et Michel Luçon. 1999. « Determination of the Nutritional Value of Proteins Obtained from *Ulva Armoricana* ». *Journal of Applied Phycology* 11 (3): 231-39.
- Fleurence, Joël, Catherine Le Coeur, Serge Mabeau, Manuelle Maurice, et Annie Landrein. 1995. « Comparison of Different Extractive Procedures for Proteins from the Edible Seaweeds *Ulva Rigida* and *Ulva Rotundata* ». *Journal of Applied Phycology* 7 (6): 577-82.
- Fligiel, Suzanne E. G., James Varani, Subhash C. Datta, Sewon Kang, Gary J. Fisher, et John J. Voorhees. 2003. « Collagen Degradation in Aged/Photodamaged Skin in Vivo and after Exposure to Matrix Metalloproteinase-1 in Vitro ». *The Journal of Investigative Dermatology* 120 (5): 842-48.
- Foster, Greg G., et Alan N. Hodgson. 1998. « Consumption and Apparent Dry Matter Digestibility of Six Intertidal Macroalgae by Turbo Sarmaticus (Mollusca: Vetigastropoda: Turbinidae) ». *Aquaculture* 167 (3-4): 211-27.
- Frances, C., et L. Robert. 1984. « Elastin and Elastic Fibers in Normal and Pathologic Skin ». *International Journal of Dermatology* 23 (3): 166-79.
- Fu, Li, Matthew Suflita, et Robert J. Linhardt. 2016. « Bioengineered Heparins and Heparan Sulfates ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 97 (février): 237-49.
- Fuchs, Katie O., Otelo Solis, Ron Tapawan, et Jayant Paranjpe. 2003. « The Effects of an Estrogen and Glycolic Acid Cream on the Facial Skin of Postmenopausal Women: A Randomized Histologic Study ». *Cutis* 71 (6): 481-88.

- Fujiwara-Arasaki, Teruko, Noriko Mino, et Mitsue Kuroda. 1984. « The Protein Value in Human Nutrition of Edible Marine Algae in Japan ». *Hydrobiologia* 116-117 (1): 513-16.
- Fukahori, Suguru, Hirohisa Yano, Jun Akiba, Sachiko Ogasawara, Seiya Momosaki, Sakiko Sanada, Keitaro Kuratomi, et al. 2008. « Fucoïdan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines in vitro ». *Molecular Medicine Reports*, juillet.

G

- Galland-Irmouli, A. V., J. Fleurence, R. Lamghari, M. Luçon, C. Rouxel, O. Barbaroux, J. P. Bronowicki, C. Villaume, et J. L. Guéant. 1999. « Nutritional Value of Proteins from Edible Seaweed *Palmaria Palmata* (Dulse) ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10 (6): 353-59.
- Gao, Gui-zhen, Qing-cai Jiao, Yi-lei Ding, et Lei Chen. 2003. « Study on quantitative assay of chondroitin sulfate with a spectrophotometric method of azure A ». *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 23 (3): 600-602.
- Ghadially, R, B E Brown, S M Sequeira-Martin, K R Feingold, et P M Elias. 1995. « The Aged Epidermal Permeability Barrier. Structural, Functional, and Lipid Biochemical Abnormalities in Humans and a Senescent Murine Model. » *Journal of Clinical Investigation* 95 (5): 2281-90.
- Ghersetich, I., T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, et G. Dini. 1994. « Hyaluronic Acid in Cutaneous Intrinsic Aging ». *International Journal of Dermatology* 33 (2): 119-22.
- Gilchrest, B. A. 1983. « In Vitro Assessment of Keratinocyte Aging ». *The Journal of Investigative Dermatology* 81 (1 Suppl): 184s-9s.
- . 1989. « Skin Aging and Photoaging: An Overview ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 21 (3 Pt 2): 610-13.
- Gilchrest, B. A., M. A. Vrabel, E. Flynn, et G. Szabo. 1984. « Selective Cultivation of Human Melanocytes from Newborn and Adult Epidermis ». *The Journal of Investigative Dermatology* 83 (5): 370-76.
- Gómez-Ordóñez, Eva, Antonio Jiménez-Escrig, et Pilar Rupérez. 2014. « Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus* ». *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 3 (1): 29-40.
- Granert, C., J. Raud, X. Xie, L. Lindquist, et L. Lindbom. 1994. « Inhibition of Leukocyte Rolling with Polysaccharide Fucoïdin Prevents Pleocytosis in Experimental Meningitis in the Rabbit ». *The Journal of Clinical Investigation* 93 (3): 929-36.
- Grauffel, V., B. Kloareg, S. Mabeau, P. Durand, et J. Jozefonvicz. 1989. « New Natural Polysaccharides with Potent Antithrombic Activity: Fucans from Brown Algae ». *Biomaterials* 10 (6): 363-68.
- Greider, C. W. 1990. « Telomeres, Telomerase and Senescence ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 12 (8): 363-69.
- Gretz, M. R., M. R. Sommerfeld, et J. M. Aronson. 1982. « Cell Wall Composition of the Generic Phase of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) ». *Botanica Marina* 25 (11).
- Guerra-Rivas, Graciela, Claudia Mariana Gómez-Gutiérrez, Gabriela Alarcón-Arteaga, Irma Esthela Soria-Mercado, et Nahara Ernestina Ayala-Sánchez. 2011. « Screening for Anticoagulant Activity in Marine Algae from the Northwest Mexican Pacific Coast ». *Journal of Applied Phycology* 23 (3): 495-503.
- Gurgel Rodrigues, Ismael Nilo Lino de Queiroz, Ana Luíza Gomes Quinderé, Bruno Cunha Vairo, Paulo Antônio de Souza Mourão, et Norma Maria Barros Benevides. 2011. « An antithrombin-dependent sulfated polysaccharide isolated from the green alga *Caulerpa cupressoides* has in vivo anti- and prothrombotic effects » 41 (4): 634-39.

H

- Hao, Li-na, Qing-zhu Zhang, Tian-gui Yu, Yan-na Cheng, et Sheng-li Ji. 2011. « Antagonistic Effects of Ultra-Low-Molecular-Weight Heparin on A β 25–35-Induced Apoptosis in Cultured Rat Cortical Neurons ». *Brain Research* 1368 (janvier): 1-10.
- Harada, N., et M. Maeda. 1998. « Chemical structure of antithrombin-active rhamnan sulfatae from *Monostrom nitidium* ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62 (9).
- Harley, C. B., A. B. Futcher, et C. W. Greider. 1990. « Telomeres Shorten during Ageing of Human Fibroblasts ». *Nature* 345 (6274): 458-60.
- Harnedy, Pádraigín A., et Richard J. FitzGerald. 2011. « Bioactive Proteins, Peptides, and Amino Acids from Macroalgae ». *Journal of Phycology* 47 (2): 218-32.
- Haug, Arne, Bjørn Larsen, et Olav Smidsrød. 1974. « Uronic Acid Sequence in Alginate from Different Sources ». *Carbohydrate Research* 32 (2): 217-25.
- Hayakawa, Y., T. Hayashi, J. Lee, P. Srisomporn, M. Maeda, T. Ozawa, et N. Sakuragawa. 2000. « Inhibition of Thrombin by Sulfated Polysaccharides Isolated from Green Algae ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1543 (1): 86-94.
- Hayflick, L. 1965. « The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains ». *Experimental Cell Research* 37 (3): 614-36.
- Hemmingson, J. A., R. Falshaw, R. H. Furneaux, et K. Thompson. 2006. « Structure and Antiviral Activity of the Galactofucan Sulfates Extracted from *Undaria Pinnatifida* (Phaeophyta) ». *Journal of Applied Phycology* 18 (2): 185-93.
- Heo, Soo-Jin, et You-Jin Jeon. 2008. « Radical Scavenging Capacity and Cytoprotective Effect of Enzymatic Digests of *Ishige Okamurae* ». *Journal of Applied Phycology* 20 (6): 1087-95.
- Hoffman, M., et D. M. Monroe. 2001. « A Cell-Based Model of Hemostasis ». *Thrombosis and Haemostasis* 85 (6): 958-65.
- Hoffman, Maureane. 2003a. « A Cell-Based Model of Coagulation and the Role of Factor VIIa ». *Blood Reviews* 17 Suppl 1 (septembre): S1-5.
- . 2003b. « Remodeling the Blood Coagulation Cascade ». *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 16 (1-2): 17-20.
- Horn, S J, I M Aasen, et K Kostgaard. 2000. « Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae* ». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24 (1): 51-57.

I

- INSERM. 2011. « La bio-ingénierie de la peau et des tissus élastiques ». <http://www.inserm.fr/thematiques/technologies-pour-la-sante/dossiers-d-information/biomateriaux/la-bio-ingenerie-de-la-peau-et-des-tissus-elastiques>.
- Iriki, Y., T. Suzuki, K. Nisizawa, et T. Miwa. 1960. « Xylan of Siphonaceous Green Algae ». *Nature* 187 (juillet): 82-83.

J

- Jaques, L. B., R. E. Balueux, C. P. Dietrich, et L. W. Kavanagh. 1968. « A microelectrophoresis method for heparin ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 46 (3): 351-60.

- Je, Jae-Young, Pyo-Jam Park, Eun-Kyung Kim, Jung-Suk Park, Ho-Dong Yoon, Kwang-Rae Kim, et Chang-Bum Ahn. 2009. « Antioxidant Activity of Enzymatic Extracts from the Brown Seaweed *Undaria Pinnatifida* by Electron Spin Resonance Spectroscopy ». *LWT - Food Science and Technology* 42 (4): 874-78.
- Jenkins, Gail. 2002. « Molecular Mechanisms of Skin Ageing ». *Mechanisms of Ageing and Development* 123 (7): 801-10.
- Jiao, Guangling, Guangli Yu, Junzeng Zhang, et H. Stephen Ewart. 2011. « Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae ». *Marine Drugs* 9 (2): 196-223.
- Jin, Weihua, Quanbin Zhang, Jing Wang, et Wenjing Zhang. 2013. « A Comparative Study of the Anticoagulant Activities of Eleven Fucoïdanes ». *Carbohydrate Polymers* 91 (1): 1-6..
- Joe, Min-Jeong, Su-Nam Kim, Hye-Young Choi, Woon-Seob Shin, Gab-Man Park, Dong-Won Kang, et Yong Kee Kim. 2006. « The Inhibitory Effects of Eckol and Dieckol from *Ecklonia Stolonifera* on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Dermal Fibroblasts ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29 (8): 1735-39.
- Jones, Roanne R., Valeria Castelletto, Che J. Connon, et Ian W. Hamley. 2013. « Collagen Stimulating Effect of Peptide Amphiphile C16-KTTKS on Human Fibroblasts ». *Molecular Pharmaceutics* 10 (3): 1063-69.
- Jurd, Karen M., David J. Rogers, Gerald Blunden, et David S. McLellan. 1995. « Anticoagulant Properties of Sulphated Polysaccharides and a Proteoglycan from *Codium Fragile* Ssp. *Atlanticum* ». *Journal of Applied Phycology* 7 (4): 339-45.

K

- Kadam, Shekhar U., Carlos Álvarez, Brijesh K. Tiwari, et Colm P. O'Donnell. 2015. « Extraction of Biomolecules from Seaweeds ». In *Seaweed Sustainability*, 243-69. Elsevier.
- Khayati, M. 2009. « Vieillesse cutané : physiologie, clinique, prévention et traitements ». *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie* 9 (50): 65-71.
- Kim, Kui-Jin, Ok-Hwan Lee, et Boo-Yong Lee. 2010. « Fucoïdan, a Sulfated Polysaccharide, Inhibits Adipogenesis through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in 3T3-L1 Preadipocytes ». *Life Sciences* 86 (21-22): 791-97.
- Kim, Myung-Suk, Ga-Hui Oh, Min-Ji Kim, et Jae-Kwan Hwang. 2013. « Fucosterol Inhibits Matrix Metalloproteinase Expression and Promotes Type-1 Procollagen Production in UVB-Induced HaCaT Cells ». *Photochemistry and Photobiology* 89 (4): 911-18.
- Kim, Se-Kwon, Y. Dominic Ravichandran, Sher Bahadar Khan, et Young Tae Kim. 2008. « Prospective of the Cosmeceuticals Derived from Marine Organisms ». *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13 (5): 511-23.
- Kim, Se-Kwon, et Isuru Wijesekara. 2011. « Anticoagulant Effect of Marine Algae ». *Advances in Food and Nutrition Research* 64: 235-44.
- Kim, Se-kwon, et Isuru Wijesekara. 2013. « Marine-Derived Peptides: Development and Health Prospects ». In *Marine Proteins and Peptides*, édité par Se-Kwon Kim, 1-3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kligman, D. 2000. « Cosmeceuticals ». *Dermatologic Clinics* 18: 609-15.
- Kloareg, B., et R.S. Quatrano. 1988. « Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides ». *Oceanography and Marine Biology: An annual review* 26: 259-315.
- Kloareg, Bernard, Maurice Demarty, et Serge Mabeau. 1986. « Polyanionic Characteristics of Purified Sulphated Homofucans from Brown Algae ». *International Journal of Biological Macromolecules* 8 (6): 380-86.
- Knutsen, S. H., D. E. Myslabodski, B. Larsen, et A. I. Usov. 1994. « A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans ». *Botanica Marina* 37 (2).
- Kohen, R., et I. Gati. 2000. « Skin Low Molecular Weight Antioxidants and Their Role in Aging and in Oxidative Stress ». *Toxicology* 148 (2-3): 149-57.
- Kraan, Stefan. 2012. « Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook ». In *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, édité par Chuan-Fa Chang. InTech.
- Kremer, Bruno P. 1979. « Photoassimilatory Products and Osmoregulation in Marine Rhodophyceae ». *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 93 (2): 139-47.

- . 1980. « Taxonomic Implications of Algal Photoassimilate Patterns ». *British Phycological Journal* 15 (4): 399-409.
- Kwon, Oh Sang, Hyeon Gyeong Yoo, Ji Hyun Han, Se Rah Lee, Jin Ho Chung, et Hee Chul Eun. 2008. « Photoaging-Associated Changes in Epidermal Proliferative Cell Fractions in Vivo ». *Archives of Dermatological Research* 300 (1): 47-52.
- Kylin, H. 1913. « Biochemistry of sea algae ». *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 83: 171-97.

L

- Labat-Robert, J, A Fourtanier, B Boyer-Lafargue, et L Robert. 2000. « Age Dependent Increase of Elastase Type Protease Activity in Mouse Skin ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 57 (2-3): 113-18.
- Lahaye, M. 1991. « Marine Algae as Sources of Fibres: Determination of Soluble and Insoluble Dietary Fibre Contents in Some 'sea Vegetables' ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54 (4): 587-94.
- Lahaye, Marc. 2001. « Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry ». *Journal of Applied Phycology* 13 (2): 173-84.
- Lahaye, Marc, Enrique Alvarez-Cabal Cimadevilla, Ralph Kuhlenkamp, Bernard Quemener, Vincent Lognoné, et Patrick Dion. 1999. « Chemical composition and ¹³C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from Ulva (Ulvales, Chlorophyta) » 11: 1-7.
- Lahaye, Marc, Magali Brunel, et Estelle Bonnin. 1997. « Fine Chemical Structure Analysis of Oligosaccharides Produced by an Ulvan-Lyase Degradation of the Water-Soluble Cell-Wall Polysaccharides from Ulva Sp. (Ulvales, Chlorophyta) ». *Carbohydrate Research* 304 (3-4): 325-33.
- Lahaye, Marc, et Bimalendu Ray. 1996. « Cell-Wall Polysaccharides from the Marine Green Alga Ulva "rigida" (Ulvales, Chlorophyta) — NMR Analysis of Ulvan Oligosaccharides ». *Carbohydrate Research* 283 (mars): 161-73.
- Lahaye, Marc, et Audrey Robic. 2007. « Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds ». *Biomacromolecules* 8 (6): 1765-74.
- Lahmann, C., J. Bergemann, G. Harrison, et A. R. Young. 2001. « Matrix Metalloproteinase-1 and Skin Ageing in Smokers ». *Lancet (London, England)* 357 (9260): 935-36.
- Lai, M.-F., et C. Lii. 1998. « Effects of Extraction Conditions on Structural and Rheological Characteristics of Agar from *Pterocladia capillacea* and Carrageenan from *Grateloupia filicina* ». *Botanica Marina* 41 (1-6).
- Laurent, T. C., et J. R. Fraser. 1992. « Hyaluronan ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6 (7): 2397-2404.
- Lechat, H. 1998. « Nature et organisation des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Euchema cottonii* ». Université de Nantes.
- Legru, Samuel. 2009. « Les troubles héréditaires de l'hémostase chez les carnivores domestiques ». Faculté de médecine de Créteil.
- Li, Bo, Fei Lu, Xinjun Wei, et Ruixiang Zhao. 2008. « Fucoïdan: Structure and Bioactivity ». *Molecules* 13 (8): 1671-95.
- Li, Hongyan, Wenjun Mao, Yujiao Hou, Yan Gao, Xiaohui Qi, Chunqi Zhao, Yin Chen, Yanli Chen, Na Li, et Chunyan Wang. 2012. « Preparation, Structure and Anticoagulant Activity of a Low Molecular Weight Fraction Produced by Mild Acid Hydrolysis of Sulfated Rhamnan from *Monostroma latissimum* ». *Bioresource Technology* 114 (juin): 414-18.
- Li, Hongyan, Wenjun Mao, Xiuli Zhang, Xiaohui Qi, Yin Chen, Yanli Chen, Jian Xu, et al. 2011. « Structural Characterization of an Anticoagulant-Active Sulfated Polysaccharide Isolated from Green Alga *Monostroma latissimum* ». *Carbohydrate Polymers* 85 (2): 394-400.
- Li, Na, Wenjun Mao, Mengxia Yan, Xue Liu, Zheng Xia, Shuyao Wang, Bo Xiao, Chenglong Chen, Lifang Zhang, et Sujian Cao. 2015. « Structural Characterization and Anticoagulant Activity of a Sulfated Polysaccharide from the Green Alga *Codium divaricatum* ». *Carbohydrate Polymers* 121 (mai): 175-82.

- Li, Pingli, Juzheng Sheng, Yuhong Liu, Juan Li, Jian Liu, et Fengshan Wang. 2013. « Heparosan-Derived Heparan Sulfate/Heparin-like Compounds: One Kind of Potential Therapeutic Agents ». *Medicinal Research Reviews* 33 (3): 665-92.
- Li, Shijie, Qingping Xiong, Xiaoping Lai, Xia Li, Mianjie Wan, Jingnian Zhang, Yajuan Yan, et al. 2016. « Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities: Molecular Modification of Polysaccharides... ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15 (2): 237-50.
- Liebler, D. C., D. S. Kling, et D. J. Reed. 1986. « Antioxidant Protection of Phospholipid Bilayers by Alpha-Tocopherol. Control of Alpha-Tocopherol Status and Lipid Peroxidation by Ascorbic Acid and Glutathione ». *The Journal of Biological Chemistry* 261 (26): 12114-19.
- Linhardt, R. J., et N. S. Gunay. 1999. « Production and Chemical Processing of Low Molecular Weight Heparins ». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 25 Suppl 3: 5-16.
- Linhardt, Robert J. 2003. « 2003 Claude S. Hudson Award Address in Carbohydrate Chemistry. Heparin: Structure and Activity ». *Journal of Medicinal Chemistry* 46 (13): 2551-64.
- Lins, Kézia O. A. L., Daniel P. Bezerra, Ana Paula N. N. Alves, Nylane M. N. Alencar, Michael W. Lima, Valeska M. Torres, Wladimir R. L. Farias, Cláudia Pessoa, Manoel O. de Moraes, et Leticia V. Costa-Lotufo. 2009. « Antitumor Properties of a Sulfated Polysaccharide from the Red Seaweed *Champia Feldmannii* (Diaz-Pifferer) ». *Journal of Applied Toxicology* 29 (1): 20-26.
- Logeart, D., S. Prigent-Richard, J. Jozefonvicz, et D. Letourneur. 1997. « Fucans, Sulfated Polysaccharides Extracted from Brown Seaweeds, Inhibit Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. I. Comparison with Heparin for Antiproliferative Activity, Binding and Internalization ». *European Journal of Cell Biology* 74 (4): 376-84.
- Lohse, D. L., et R. J. Linhardt. 1992. « Purification and Characterization of Heparin Lyases from *Flavobacterium heparinum* ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (34): 24347-55.
- Longas, M. O., C. S. Russell, et X. Y. He. 1987. « Evidence for Structural Changes in Dermatan Sulfate and Hyaluronic Acid with Aging ». *Carbohydrate Research* 159 (1): 127-36.
- Lopez-Torres, Monica, Yasuko Shindo, et Lester Packer. 1994. « Effect of Age on Antioxidants and Molecular Markers of Oxidative Damage in Murine Epidermis and Dermis ». *Journal of Investigative Dermatology* 102 (4): 476-80.
- Lourenco, Sergio O., Elisabete Barbarino, Joel C. De-Paula, Luis Otavio da S. Pereira, et Ursula M. Lanfer Marquez. 2002. « Amino Acid Composition, Protein Content and Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for 19 Tropical Seaweeds ». *Phycological Research* 50 (3): 233-41.
- Love, Jim, et Elizabeth Percival. 1964. « The Polysaccharides of the Green Seaweed *Codium Fragile*. Part II. The Water-Soluble Sulphated Polysaccharides ». *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3338.

M

- Mabeau, Serge, et Joël Fleurence. 1993. « Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects ». *Trends in Food Science & Technology* 4 (4): 103-7.
- Maeda, M., T. Uehara, N. Harada, M. Sekiguchi, et A. Hiraoka. 1991. « Heparinoid-Active Sulphated Polysaccharides from *Monostroma Nitidum* and Their Distribution in the Chlorophyta ». *Phytochemistry*.
- Majdoub, Hatem, Mohamed Ben Mansour, Frédéric Chaubet, Mohamed S. Roudesli, et Raoui M. Maaroufi. 2009. « Anticoagulant Activity of a Sulfated Polysaccharide from the Green Alga *Arthrospira Platensis* ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1790 (10): 1377-81.
- Manuskiatti, Woraphong, et Howard I. Maibach. 1996. « HYALURONIC ACID AND SKIN: WOUND HEALING AND AGING ». *International Journal of Dermatology* 35 (8): 539-44.
- Mao, Wen-Jun, Fang Fang, Hong-Yan Li, Xiao-Hui Qi, Hai-Hong Sun, Yin Chen, et Shou-Dong Guo. 2008. « Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum* ». *Carbohydrate Polymers* 74 (4): 834-39.
- Mao, Wenjun, Hongyan Li, Yi Li, Huijuan Zhang, Xiaohui Qi, Haihong Sun, Yin Chen, et Shoudong Guo. 2009. « Chemical Characteristic and Anticoagulant Activity of the Sulfated Polysaccharide Isolated from *Monostroma Latissimum* (Chlorophyta) ». *International Journal of Biological Macromolecules* 44 (1): 70-74.

- Mao, Wenjun, Xiaoxue Zang, Yi Li, et Huijuan Zhang. 2006. « Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae *Ulva Conglobata* and Their Anticoagulant Activity ». *Journal of Applied Phycology* 18 (1): 9-14.
- Marcucci, C, et PG Chassot. 2015. « Précis d'anesthésie cardiaque - Chapitre 8: Coagulation, anticoagulation et hémostasie en chirurgie cardiaque ».
- Marinho-Soriano, E., P. C. Fonseca, M. a. A. Carneiro, et W. S. C. Moreira. 2006. « Seasonal Variation in the Chemical Composition of Two Tropical Seaweeds ». *Bioresource Technology* 97 (18): 2402-6.
- Markwardt, Fritz. 1993. « Hirudin: The Famous Anticoagulant Agent ». In *The Design of Synthetic Inhibitors of Thrombin*, édité par Goran Claesson, Michael F. Scully, Vijay V. Kakkar, et John Deadman, 340:191-211. Boston, MA: Springer US.
- Martínez, Brezo, et Jose M. Rico. 2002. « Seasonal variation of p content and major n pools in *palmaria palmata* (rhodophyta)¹ ». *Journal of Phycology* 38 (6): 1082-89.
- Martini, Marie-Claude. 2011. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie (3e ed.)*. Lavoisier.
- Matrisian, L. M. 1992. « The Matrix-Degrading Metalloproteinases ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 14 (7): 455-63.
- Matsubara, Kiminori. 2004. « Recent Advances in Marine Algal Anticoagulants ». *Current Medicinal Chemistry. Cardiovascular and Hematological Agents* 2 (1): 13-19.
- Matsubara, Kiminori, Yasushi Matsuura, Antony Bacic, Ming-Long Liao, Kanji Hori, et Keisuke Miyazawa. 2001. « Anticoagulant Properties of a Sulfated Galactan Preparation from a Marine Green Alga, *Codium Cylindricum* ». *International Journal of Biological Macromolecules* 28 (5): 395-99.
- Mauray, S., C. Sternberg, J. Theveniaux, J. Millet, C. Sinquin, J. Tapon-Bretonnière, et A. M. Fischer. 1995. « Venous Antithrombotic and Anticoagulant Activities of a Fucoidan Fraction ». *Thrombosis and Haemostasis* 74 (5): 1280-85.
- McCandless, E. L. 1978. « The importance of cell wall constituents in algal taxonomy ». In *Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae*, Academic press, 63-85. London and New York: Irvine D. E. G. & Price J. H.
- McHugh, Dennis. 2003. « A guide to the seaweed industry ». Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- McLean, Jay. 1916. « The thromboplastic action of cephalin ». *American journal of physiology*.
- McNeill, M., A G. Carvill, S. C. Fry, et P. Albersheim. 1984. « Structure and function of the primary cell wall in plants ». *Ann. Rev. Biochem.*, n° 53: 625-63.
- Medcalf, Darrell G., Terry L. Schneider, et Richard W. Barnett. 1978. « Structural Features of a Novel Glucuronogalactofucan from *Ascophyllum Nodosum* ». *Carbohydrate Research* 66 (1): 167-71.
- Medrano, E. E., F. Yang, R. Boissy, J. Farooqui, V. Shah, K. Matsumoto, J. J. Nordlund, et H. Y. Park. 1994. « Terminal Differentiation and Senescence in the Human Melanocyte: Repression of Tyrosine-Phosphorylation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 Selectively Defines the Two Phenotypes ». *Molecular Biology of the Cell* 5 (4): 497-509.
- Mélissopoulos, Alexandre, et Christine Levacher. 1998. *La peau: structure et physiologie*. Tec & Doc Lavoisier.
- Melo, Fábio R., Mariana S. Pereira, Débora Foguel, et Paulo A. S. Mourão. 2004. « Antithrombin-Mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides: Different Mechanisms for Heparin and Sulfated Galactans ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (20): 20824-35.
- Mets, T., E. Bekaert, et G. Verdonk. 1983. « Similarity between in vitro and in vivo cellular aging ». *Mechanisms of Ageing and Development* 22 (1): 71-78.
- Meyer, K. 1958. « Chemical Structure of Hyaluronic Acid ». *Federation Proceedings* 17 (4): 1075-77.
- Mian, A.Jabbar, et Elizabeth Percival. 1973. « Carbohydrates of the Brown Seaweeds *Himantalia Lorea*, *Bifurcaria Bifurcata*, and *Padina Pavonia* ». *Carbohydrate Research* 26 (1): 133-46.
- Millis, A. J., M. Hoyle, H. M. McCue, et H. Martini. 1992. « Differential Expression of Metalloproteinase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Genes in Aged Human Fibroblasts ». *Experimental Cell Research* 201 (2): 373-79.
- Mishra, V.K., F. Temelli, B. Oraikul, P.F. Shacklock, et J.S. Craigie. 2009. « Lipids of the red alga, *Palmaria palmata* ». *Botanica Marina* 36 (2): 169-74.
- Mohamed, Suhaila, Siti Nadia Hashim, et Hafeedza Abdul Rahman. 2012. « Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy ». *Trends in Food Science & Technology* 23 (2): 83-96.
- Montagnat-Rentier, Charlotte. 2014. « Vieillesse de la peau et les produits cosmétiques anti-âge actuels en pharmacie: la réglementation, leur composition, leur efficacité et l'attente des clients ». Grenoble: Joseph Fourier.

- Moon, Hee Jung, Sang Ho Lee, Mi Jeong Ku, Byeng Chul Yu, Man Joong Jeon, Seok Hoon Jeong, Valentin A. Stonik, Tatyana N. Zvyagintseva, Svetlana P. Ermakova, et Yong Hwan Lee. 2009. « Fucoidan Inhibits UVB-Induced MMP-1 Promoter Expression and down Regulation of Type I Procollagen Synthesis in Human Skin Fibroblasts ». *European Journal of Dermatology: EJD* 19 (2): 129-34.
- Morgan, K. C., et F. J. Simpson. 1981. « The Cultivation of *Palmaria palmata*. Effect of Light Intensity and Temperature on Growth and Chemical Composition ». *Botanica Marina* 24 (10).
- Morgan, K.C., et F.J. Simpson. 1981. « Cultivation of *Palmaria* (*Rhodymenia*) *Palmata*: Effect of High Concentrations of Nitrate and Ammonium on Growth and Nitrogen Uptake ». *Aquatic Botany* 11 (janvier): 167-71.
- Morgan, Keith C., Jeffrey L. C. Wright, et F. J. Simpson. 1980. « Review of Chemical Constituents of the Red Alga *Palmaria Palmata* (Dulse) ». *Economic Botany* 34 (1): 27-50.
- Morrissey, J., S. Kraan, et M.D. Guiry. 2001. *A guide to commercially important seaweeds on the Irish coast*. Dublin, Irlande: Bord Iascaigh Mhara/Irish Sea Fisheries Board.
- 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.
- Mourão, Paulo A. S. 2004. « Use of Sulfated Fucans as Anticoagulant and Antithrombotic Agents: Future Perspectives ». *Current Pharmaceutical Design* 10 (9): 967-81.
- Mulloy, B., J. Hogwood, et E. Gray. 2010. « Assays and Reference Materials for Current and Future Applications of Heparins ». *Biologicals* 38 (4): 459-66.
- Murata, M, et J Nakazoe. 2001. « Production and use of marine in Japan ». Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Myllyharju, J., et K. I. Kivirikko. 2001. « Collagens and Collagen-Related Diseases ». *Annals of Medicine* 33 (1): 7-21.

N

- Nagaoka, M., H. Shibata, I. Kimura-Takagi, S. Hashimoto, K. Kimura, T. Makino, R. Aiyama, S. Ueyama, et T. Yokokura. 1999. « Structural Study of Fucoidan from *Cladosiphon Okamuraanus* TOKIDA ». *Glycoconjugate Journal* 16 (1): 19-26.
- Neerken, Sieglinde, Gerald W. Lucassen, Marielle A. Bisschop, Egbert Lenderink, et Tom A. M. Nuijs. 2004. « Characterization of Age-Related Effects in Human Skin: A Comparative Study That Applies Confocal Laser Scanning Microscopy and Optical Coherence Tomography ». *Journal of Biomedical Optics* 9 (2): 274-81.
- Nelson, W.L., et L.H. Cretcher. 1931. « The carbohydrate acid sulfate of *Macrocystis pyrifera* ». *The Journal of Biological Chemistry* 94: 147-54.
- Ning, Y. 2003. « Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts ». *Human Molecular Genetics* 12 (11): 1329-36.
- Nishino, T., Y. Aizu, et T. Nagumo. 1991a. « Antithrombin Activity of a Fucan Sulfate from the Brown Seaweed *Ecklonia Kurome* ». *Thrombosis Research* 62 (6): 765-73.
- . 1991b. « The Influence of Sulfate Content and Molecular Weight of a Fucan Sulfate from the Brown Seaweed *Ecklonia Kurome* on Its Antithrombin Activity ». *Thrombosis Research* 64 (6): 723-31.
- Noda, Hiroyuki, Hideomi Amano, Koichi Arashima, et Kazutosi Nisizawa. 1990. « Antitumor activity of marine algae ». *Hydrobiologia* 204 (1): 577-84.

O

- Oreste, P, et G Zoppetti. 2012. « Semi-synthetic heparinoids ». In *Heparin - A century of progress*, 207:403-22. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Science & Business Media.

Ortiz, J., N. Romero, P. Robert, J. Araya, J. Lopez-Hernández, C. Bozzo, E. Navarrete, A. Osorio, et A. Rios. 2006. « Dietary Fiber, Amino Acid, Fatty Acid and Tocopherol Contents of the Edible Seaweeds *Ulva Lactuca* and *Durvillaea Antarctica* ». *Food Chemistry* 99 (1): 98-104.

P

- Passeron, Thierry, et Jean-Paul Ortonne. 2003. « Le vieillissement cutané et sa prévention ». *La Presse Médicale* 32 (31): 1474-82.
- Patankar, M. S., S. Oehninger, T. Barnett, R. L. Williams, et G. F. Clark. 1993. « A Revised Structure for Fucoidan May Explain Some of Its Biological Activities ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (29): 21770-76.
- Percival, Elizabeth. 1968. « Glucuronoxylfucan, a Cell-Wall Component of *Ascophyllum Nodosum*. Part I ». *Carbohydrate Research* 7 (3): 272-83.
- Percival, Elizabeth, et Richard H. McDowell. 1967. *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*. Academic Press.
- Pereira, Maria G., Norma M.B. Benevides, Marcia R.S. Melo, Ana Paula Valente, Fábio R. Melo, et Paulo A.S. Mourão. 2005. « Structure and Anticoagulant Activity of a Sulfated Galactan from the Red Alga, *Gelidium Crinale*. Is There a Specific Structural Requirement for the Anticoagulant Action? ». *Carbohydrate Research* 340 (12): 2015-23.
- Pereira, Mariana S., Barbara Mulloy, et Paulo A. S. Mourão. 1999. « Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans COMPARISON BETWEEN THE REGULAR, REPETITIVE, AND LINEAR FUCANS FROM ECHINODERMS WITH THE MORE HETEROGENEOUS AND BRANCHED POLYMERS FROM BROWN ALGAE ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 7656-67.
- Pérez, René. 1997. *Ces algues qui nous entourent: conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture*. Quae.
- Person, Julie. 2011. « Algues, filières du futur . Livre turquoise ». Adebitech.
- Petersen, M. J., C. Hansen, et S. Craig. 1992. « Ultraviolet A Irradiation Stimulates Collagenase Production in Cultured Human Fibroblasts ». *The Journal of Investigative Dermatology* 99 (4): 440-44.
- Pomponi, Shirley A. 1999. « The Bioprocess–technological Potential of the Sea ». *Journal of Biotechnology* 70 (1-3): 5-13.
- Prost-squarcioni, C., S. Fraitag, M. Heller, et N. Boehm. 2008. « Histologie fonctionnelle du derme ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, Derme et vieillissement : techniques de comblement, 135 (1, Part 3): 5-20.
- Pujol, Carlos A., Sayani Ray, Bimalendu Ray, et Elsa B. Damonte. 2012. « Antiviral Activity against Dengue Virus of Diverse Classes of Algal Sulfated Polysaccharides ». *International Journal of Biological Macromolecules* 51 (4): 412-16.

Q

- Qi, Xiaohui, Wenjun Mao, Yan Gao, Yin Chen, Yanli Chen, Chunqi Zhao, Na Li, et al. 2012. « Chemical Characteristic of an Anticoagulant-Active Sulfated Polysaccharide from *Enteromorpha Clathrata* ». *Carbohydrate Polymers* 90 (4): 1804-10.

R

- Rabanal, Melissa, Nora M. A. Ponce, Diego A. Navarro, Ricardo M. Gómez, et Carlos A. Stortz. 2014. « The System of Fucoidans from the Brown Seaweed Dictyota Dichotoma: Chemical Analysis and Antiviral Activity ». *Carbohydrate Polymers* 101 (janvier): 804-11.
- Radmer, Richard J., et Bruce C. Parker. 1994. « Commercial Applications of Algae: Opportunities and Constraints ». *Journal of Applied Phycology* 6 (2): 93-98.
- Rasmussen, Rosalee S., et Michael T. Morrissey. 2007. « Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients ». *Advances in Food and Nutrition Research* 52: 237-92.
- Ravelojaona, V., A.-M. Robert, L. Robert, et G. Renard. 2008. « Collagen Biosynthesis in Cell Culture: Comparison of Corneal Keratocytes and Skin Fibroblasts. Effect of Rhamnose-Rich Oligo- and Polysaccharides ». *Pathologie-Biologie* 56 (2): 66-69.
- Ray, B., et M. Lahaye. 1995. « Cell-Wall Polysaccharides from the Marine Green Alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and Chemical Composition ». *Carbohydrate Research* 274 (septembre): 251-61.
- Ray, Bimalendu. 2006. « Polysaccharides from *Enteromorpha Compressa*: Isolation, Purification and Structural Features ». *Carbohydrate Polymers* 66 (3): 408-16.
- Reed, R. K., K. Lilja, et T. C. Laurent. 1988. « Hyaluronan in the Rat with Special Reference to the Skin ». *Acta Physiologica Scandinavica* 134 (3): 405-11.
- Rest, M. van der, et R. Garrone. 1991. « Collagen Family of Proteins ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5 (13): 2814-23.
- Ricard-Blum, Sylvie, et Florence Ruggiero. 2005. « The Collagen Superfamily: From the Extracellular Matrix to the Cell Membrane ». *Pathologie-Biologie* 53 (7): 430-42.
- Richard, Benjamin. 2013. « Physiologie de la coagulation ».
- Rioux, Laurie-Eve, Véronique Moulin, Martin Beaulieu, et Sylvie L. Turgeon. 2013. « Human Skin Fibroblast Response Is Differentially Regulated by Galactofucan and Low Molecular Weight Galactofucan ». *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 1 (2): 105-10.
- Rioux, L.-E., S.L. Turgeon, et M. Beaulieu. 2007. « Characterization of Polysaccharides Extracted from Brown Seaweeds ». *Carbohydrate Polymers* 69 (3): 530-37.
- Robert, Daniel, et Anne-Marie Catesson. 2000. *Organisation végétative*. Biologie végétale: caractéristiques et stratégie évolutive des plantes. Doin.
- Robert, L. 2015. « Hyaluronan, a Truly "youthful" polysaccharide. Its Medical Applications ». *Pathologie-Biologie* 63 (1): 32-34.
- Robic, A., C. Rondeau-Mouro, J.-F. Sassi, Y. Lerat, et M. Lahaye. 2009. « Structure and Interactions of Ulvan in the Cell Wall of the Marine Green Algae *Ulva Rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae) ». *Carbohydrate Polymers* 77 (2): 206-16.
- Robic, Audrey, Jean-François Sassi, Patrick Dion, Yannick Lerat, et Marc Lahaye. 2009. « Seasonal Variability of Physicochemical and Rheological Properties of Ulvan in Two *Ulva* Species (Chlorophyta) from the Brittany Coast ». *Journal of Phycology* 45 (4): 962-73.
- Rocha de Souza, Micheline Cristiane, Cybelle Teixeira Marques, Celina Maria Guerra Dore, Fernando Roberto Ferreira da Silva, Hugo Alexandre Oliveira Rocha, et Edda Lisboa Leite. 2007. « Antioxidant Activities of Sulfated Polysaccharides from Brown and Red Seaweeds ». *Journal of Applied Phycology* 19 (2): 153-60.
- Rocha, Hugo A. O., Fábio A. Moraes, Edvaldo S. Trindade, Célia R. C. Franco, Ricardo J. S. Torquato, Silvio S. Veiga, Ana P. Valente, et al. 2005. « Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum Schroederi*. An Ideal Antithrombotic Agent? » *The Journal of Biological Chemistry* 280 (50): 41278-88.
- Rødde, Ruth S. Hagen, Kjell M. Vårum, Bjørn A. Larsen, et Sverre M. Myklestad. 2004. « Seasonal and geographical variation in the chemical composition of the red alga *Palmaria palmata* (L.) Kuntze ». *Botanica Marina* 47 (2).
- Rodriguez-Jasso, Rosa M., Solange I. Mussatto, Lorenzo Pastrana, Cristóbal N. Aguilar, et José A. Teixeira. 2011. « Microwave-Assisted Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) from Brown Seaweed ». *Carbohydrate Polymers* 86 (3): 1137-44.
- Roshan, S., S. Nader, et P. Orlander. 1999. « Review: Ageing and Hormones ». *European Journal of Clinical Investigation* 29 (3): 210-13.

- Rouxel, Catherine, André Daniel, Marc Jérôme, Monique Etienne, et Joël Fleurence. 2001. « Species Identification by SDS-PAGE of Red Algae Used as Seafood or a Food Ingredient ». *Food Chemistry* 74 (3): 349-53.
- Rupérez, P., et Fulgencio Saura-Calixto. 2001. « Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds ». *European Food Research and Technology* 212 (3): 349-54.
- Rupérez, Pilar, Oussama Ahrazem, et J. Antonio Leal. 2002. « Potential Antioxidant Capacity of Sulfated Polysaccharides from the Edible Marine Brown Seaweed *Fucus Vesiculosus* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (4): 840-45.
- Russell-Aulet, M., E. V. Dimaraki, C. A. Jaffe, R. DeMott-Friberg, et A. L. Barkan. 2001. « Aging-Related Growth Hormone (GH) Decrease Is a Selective Hypothalamic GH-Releasing Hormone Pulse Amplitude Mediated Phenomenon ». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 56 (2): M124-129.

S

- Saarialho-Kere, U., E. Kerkelä, L. Jeskanen, T. Hasan, R. Pierce, B. Starcher, R. Raudasoja, A. Ranki, A. Oikarinen, et M. Vaalamo. 1999. « Accumulation of Matrilysin (MMP-7) and Macrophage Metalloelastase (MMP-12) in Actinic Damage ». *The Journal of Investigative Dermatology* 113 (4): 664-72.
- Samarakoon, Kalpa, et You-Jin Jeon. 2012. « Bio-Functionalities of Proteins Derived from Marine Algae — A Review ». *Food Research International* 48 (2): 948-60.
- Sathivel, Arumugam, Hanumantha Rao Balaji Raghavendran, Periasamy Srinivasan, et Thiruvengadam Devaki. 2008. « Anti-Peroxidative and Anti-Hyperlipidemic Nature of *Ulva Lactuca* Crude Polysaccharide on D-Galactosamine Induced Hepatitis in Rats ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 46 (10): 3262-67.
- Sattari, Maryam, et David T. Lowenthal. 2011. « Novel Oral Anticoagulants in Development: Dabigatran, Rivaroxaban, and Apixaban ». *American Journal of Therapeutics* 18 (4): 332-38.
- Schiele, F. 2001. « Anti-coagulants: principes et règles d'utilisation des anti-vitamines K (AVK) ».
- Schneider, E. L., et Y. Mitsui. 1976. « The Relationship between in Vitro Cellular Aging and in Vivo Human Age ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (10): 3584-88.
- Schved, J.F. 2007. « Physiologie de l'hémostase ».
- Senni, Karim, Farida Gueniche, Alexandrine Foucault-Bertaud, Sylvie Igondjo-Tchen, Florence Fioretti, Sylvia Collic-Jouault, Patrick Durand, Jean Guezennec, Gaston Godeau, et Didier Letourneur. 2006. « Fucoidan a Sulfated Polysaccharide from Brown Algae Is a Potent Modulator of Connective Tissue Proteolysis ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445 (1): 56-64.
- Shanmugam, M., K. H. Mody, et A. K. Siddhanta. 2001. « Blood Anticoagulant Sulphated Polysaccharides of the Marine Green Algae *Codium Dwarkense* (Boergs.) and *C. Tomentosum* (Huds.) Stackh ». *Indian Journal of Experimental Biology* 39 (4): 365-70.
- Siddhanta, A. K., M. Shanmugam, K. H. Mody, A. M. Goswami, et B. K. Ramavat. 1999. « Sulphated Polysaccharides of *Codium Dwarkense* Boergs. from the West Coast of India: Chemical Composition and Blood Anticoagulant Activity ». *International Journal of Biological Macromolecules* 26 (2-3): 151-54.
- Simon, D., P. Preziosi, E. Barrett-Connor, M. Roger, M. Saint-Paul, K. Nahoul, et L. Papoz. 1992. « The Influence of Aging on Plasma Sex Hormones in Men: The Telecom Study ». *American Journal of Epidemiology* 135 (7): 783-91.
- Singleton, V. L., et Joseph A. Rossi. 1965. « Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents ». *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (3): 144-58.
- Sinquin, C., et S. Collic-Jouault. 2014. « Les polysaccharides marins et leurs applications dans le domaine de la santé - Polysaccharides de macroalgues et leurs dérivés bioactifs ». *Techniques de l'ingénieur*.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goekke, B.J. Olson, et D.C. Klenk. 1985. « Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid ». *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76-85.

- Solly, S. 1856. « Clinical lectures on paralysis ». *The Lancet* 68 (1737): 641-43.
- Sommers, Cynthia D., Hongping Ye, Richard E. Kolinski, Moheb Nasr, Lucinda F. Buhse, Ali Al-Hakim, et David A. Keire. 2011. « Characterization of Currently Marketed Heparin Products: Analysis of Molecular Weight and Heparinase-I Digest Patterns ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401 (8): 2445-54.
- Souza, Bartolomeu W.S., Miguel A. Cerqueira, Ana I. Bourbon, Ana C. Pinheiro, Joana T. Martins, José A. Teixeira, Manuel A. Coimbra, et António A. Vicente. 2012. « Chemical Characterization and Antioxidant Activity of Sulfated Polysaccharide from the Red Seaweed *Gracilaria Birdiae* ». *Food Hydrocolloids* 27 (2): 287-92.
- Stein, B., H. J. Rahmsdorf, A. Steffen, M. Litfin, et P. Herrlich. 1989. « UV-Induced DNA Damage Is an Intermediate Step in UV-Induced Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1, Collagenase, c-Fos, and Metallothionein ». *Molecular and Cellular Biology* 9 (11): 5169-81.
- Stern, Robert, et Howard I. Maibach. 2008. « Hyaluronan in Skin: Aspects of Aging and Its Pharmacologic Modulation ». *Clinics in Dermatology* 26 (2): 106-22.
- Stiger-Pouvreau, V., N. Bourgoignon, et E. Deslandes. 2016. « Carbohydrates from seaweeds ». In *Seaweed in health and disease prevention*, Elsevier, 223-74. Boston, MA: Joel Fleurence and Ira Levine.
- Synytysya, Andriy, Doo Jin Choi, Radek Pohl, Ye Seul Na, Peter Capek, Erika Lattová, Tomáš Taubner, et al. 2015. « Structural Features and Anti-Coagulant Activity of the Sulphated Polysaccharide SPS-CF from a Green Alga *Capsosiphon Fulvescens* ». *Marine Biotechnology* 17 (6): 718-35.

T

- Taylor, K. R. 2006. « Glycosaminoglycans and Their Proteoglycans: Host-Associated Molecular Patterns for Initiation and Modulation of Inflammation ». *The FASEB Journal* 20 (1): 9-22. doi:10.1096/fj.05-4682rev.
- Thomas, Noel, et Se-Kwon Kim. 2013. « Beneficial Effects of Marine Algal Compounds in Cosmeceuticals ». *Marine Drugs* 11 (1): 146-64.
- Tiwari, Brijesh K., et Declan Troy. 2015. *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*. 1st edition. Academic Press.
- Tseng, C.K. 2001. « Algal biotechnology industries and research in China ». *Journal of Applied Phycology* 13 (4): 375-80.

U

- Uitto, J. 1979. « Biochemistry of the Elastic Fibers in Normal Connective Tissues and Its Alterations in Diseases ». *The Journal of Investigative Dermatology* 72 (1): 1-10.
- . 1986. « Connective Tissue Biochemistry of the Aging Dermis. Age-Related Alterations in Collagen and Elastin ». *Dermatologic Clinics* 4 (3): 433-46.
- Uitto, J., et E. F. Bernstein. 1998. « Molecular Mechanisms of Cutaneous Aging: Connective Tissue Alterations in the Dermis ». *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* 3 (1): 41-44.
- Ushakova, N. A., G. E. Morozovich, N. E. Ustyuzhanina, M. I. Bilan, A. I. Usov, N. E. Nifantiev, et M. E. Preobrazhenskaya. 2009. « Anticoagulant Activity of Fucoidans from Brown Algae ». *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 3 (1): 77-83.
- Usov, A.I. 1998. « Structural Analysis of Red Seaweed Galactans of Agar and Carrageenan Groups ». *Food Hydrocolloids* 12 (3): 301-8.

V

- Valero, Myriam, et Jose Godin. 1992. « Biology of the Red Algae ». *Journal of Evolutionary Biology* 5 (3): 533-36.
- Van Gogh Investigators, Harry R. Buller, Ander T. Cohen, Bruce Davidson, Hervé Decousus, Alex S. Gallus, Michael Gent, et al. 2007. « Idraparinux versus Standard Therapy for Venous Thromboembolic Disease ». *The New England Journal of Medicine* 357 (11): 1094-1104.
- Varani, James, Michael K. Dame, Laure Rittie, Suzanne E.G. Fligel, Sewon Kang, Gary J. Fisher, et John J. Voorhees. 2006. « Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin ». *The American Journal of Pathology* 168 (6): 1861-68.
- Ventura, M.R, et J.I.R Castañón. 1998. « The Nutritive Value of Seaweed (*Ulva Lactuca*) for Goats ». *Small Ruminant Research* 29 (3): 325-27.
- Vigetti, Davide, Eugenia Karousou, Manuela Viola, Sara Deleonibus, Giancarlo De Luca, et Alberto Passi. 2014. « Hyaluronan: Biosynthesis and Signaling ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (8): 2452-59.
- Vries, D. J. de, et P. M. Beart. 1995. « Fishing for Drugs from the Sea: Status and Strategies ». *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (8): 275-79.

W

- Wang, E. 1995. « Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress bcl2 Is Involved ». *Cancer Research* 55 (11): 2284-92.
- Wang, Hui-Min David, Ching-Chun Chen, Pauline Huynh, et Jo-Shu Chang. 2015. « Exploring the Potential of Using Algae in Cosmetics ». *Bioresource Technology* 184 (mai): 355-62. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.001.
- Wang, Jing, Quanbin Zhang, Zhongshan Zhang, et Zhien Li. 2008. « Antioxidant Activity of Sulfated Polysaccharide Fractions Extracted from *Laminaria Japonica* ». *International Journal of Biological Macromolecules* 42 (2): 127-32.
- Wang, Jing, Quanbin Zhang, Zhongshan Zhang, Houfang Song, et Pengcheng Li. 2010. « Potential Antioxidant and Anticoagulant Capacity of Low Molecular Weight Fucoidan Fractions Extracted from *Laminaria Japonica* ». *International Journal of Biological Macromolecules* 46 (1): 6-12.
- Wang, Lingchong, Xiangyu Wang, Hao Wu, et Rui Liu. 2014. « Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae in Recent Years ». *Marine Drugs* 12 (9): 4984-5020.
- Wang, Tao, Rósa Jónsdóttir, Haiyan Liu, Liwei Gu, Hordur G. Kristinsson, Sivakumar Raghavan, et Guðrún Ólafsdóttir. 2012. « Antioxidant Capacities of Phlorotannins Extracted from the Brown Algae *Fucus Vesiculosus* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (23): 5874-83.
- Wang, Xiaomei, Zhongshan Zhang, Zhiyun Yao, Mingxing Zhao, et Huimin Qi. 2013. « Sulfation, Anticoagulant and Antioxidant Activities of Polysaccharide from Green Algae *Enteromorpha Linza* ». *International Journal of Biological Macromolecules* 58 (juillet): 225-30.
- Warkentin, T. E., M. N. Levine, J. Hirsh, P. Horsewood, R. S. Roberts, M. Gent, et J. G. Kelton. 1995. « Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Treated with Low-Molecular-Weight Heparin or Unfractionated Heparin ». *The New England Journal of Medicine* 332 (20): 1330-35.
- Wei, Y. H., C. Y. Lu, C. Y. Wei, Y. S. Ma, et H. C. Lee. 2001. « Oxidative Stress in Human Aging and Mitochondrial Disease-Consequences of Defective Mitochondrial Respiration and Impaired Antioxidant Enzyme System ». *The Chinese Journal of Physiology* 44 (1): 1-11.
- Weitz, J. I., M. Hudoba, D. Massel, J. Maraganore, et J. Hirsh. 1990. « Clot-Bound Thrombin Is Protected from Inhibition by Heparin-Antithrombin III but Is Susceptible to Inactivation by Antithrombin III-Independent Inhibitors ». *The Journal of Clinical Investigation* 86 (2): 385-91.

- Weitz, Jeffrey I. 2006. « Emerging Anticoagulants for the Treatment of Venous Thromboembolism ». *Thrombosis and Haemostasis* 96 (3): 274-84.
- Weitz, Jeffrey I., Jack Hirsh, et Meyer M. Samama. 2004. « New Anticoagulant Drugs: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy ». *Chest* 126 (3 Suppl): 265S-286S.
- Wen, Xue, Changlian Peng, Houcheng Zhou, Zhifang Lin, Guizhu Lin, Shaowei Chen, et Ping Li. 2006. « Nutritional Composition and Assessment of *Gracilaria Lemaneiformis* Bory ». *Journal of Integrative Plant Biology* 48 (9): 1047-53.
- Werth, V. P., K. J. Williams, E. A. Fisher, M. Bashir, J. Rosenbloom, et X. Shi. 1997. « UVB Irradiation Alters Cellular Responses to Cytokines: Role in Extracellular Matrix Gene Expression ». *The Journal of Investigative Dermatology* 108 (3): 290-94.
- West, M. D., O. M. Pereira-Smith, et J. R. Smith. 1989. « Replicative Senescence of Human Skin Fibroblasts Correlates with a Loss of Regulation and Overexpression of Collagenase Activity ». *Experimental Cell Research* 184 (1): 138-47.
- Wick, M., C. Bürger, S. Brüsselbach, F. C. Lucibello, et R. Müller. 1994. « A Novel Member of Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) Gene Family Is Regulated during G1 Progression, Mitogenic Stimulation, Differentiation, and Senescence ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (29): 18953-60.
- Witvrouw, M., et E. De Clercq. 1997. « Sulfated Polysaccharides Extracted from Sea Algae as Potential Antiviral Drugs ». *General Pharmacology* 29 (4): 497-511.
- Wong, K.H., et Peter C.K. Cheung. 2000. « Nutritional Evaluation of Some Subtropical Red and Green Seaweeds ». *Food Chemistry* 71 (4): 475-82.

X

- Xiao, Zhongping, Britney R. Tappen, Mellisa Ly, Wenjing Zhao, Lauren P. Canova, Huashi Guan, et Robert J. Linhardt. 2011. « Heparin Mapping Using Heparin Lyases and the Generation of a Novel Low Molecular Weight Heparin ». *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (2): 603-10.

Y

- Yaich, Hela, Haikel Garna, Souhail Besbes, Michel Paquot, Christophe Blecker, et Hamadi Attia. 2013. « Effect of Extraction Conditions on the Yield and Purity of Ulvan Extracted from *Ulva Lactuca* ». *Food Hydrocolloids* 31 (2): 375-82.
- Ye, Fengchun, Ying Kuang, Shuo Chen, Chong Zhang, Yin Chen, et Xin-Hui Xing. 2009. « Characteristics of Low Molecular Weight Heparin Production by an Ultrafiltration Membrane Bioreactor Using Maltose Binding Protein Fused Heparinase I ». *Biochemical Engineering Journal* 46 (2): 193-98.
- Ye, Hong, Keqi Wang, Chunhong Zhou, Jun Liu, et Xiaoxiong Zeng. 2008. « Purification, Antitumor and Antioxidant Activities in Vitro of Polysaccharides from the Brown Seaweed *Sargassum Pallidum* ». *Food Chemistry* 111 (2): 428-32.
- Young, E. G., et D. G. Smith. 1958. « Amino Acids, Peptides, and Proteins of Irish Moss, *Chondrus Crispus* ». *The Journal of Biological Chemistry* 233 (2): 406-10.

Z

- Zhang, F. 1998. *Synthetic and natural polysaccharides with anticoagulant properties*.
- Zhang, Hui-Juan, Wen-Jun Mao, Fang Fang, Hong-Yan Li, Hai-Hong Sun, Yin Chen, et Xiao-Hui Qi. 2008. « Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum* ». *Carbohydrate Polymers* 71 (3): 428-34.
- Zorofchian Moghadamtousi, Soheil, Hamed Karimian, Ramin Khanabdali, Mahboubeh Razavi, Mohammad Firoozinia, Keivan Zandi, et Habsah Abdul Kadir. 2014. « Anticancer and Antitumor Potential of Fucoidan and Fucoxanthin, Two Main Metabolites Isolated from Brown Algae ». *The Scientific World Journal* 2014: 1-10.
- Zubia, Mayalen, Daniel Robledo, et Yolanda Freile-Pelegrin. 2007. « Antioxidant Activities in Tropical Marine Macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico ». *Journal of Applied Phycology* 19 (5): 449-58.

Production pilote de polysaccharides sulfatés issus de macroalgues marines à visées anti-coagulante et cosmétique anti-âge

Résumé :

L'entreprise SEPROSYS est une société spécialisée dans le développement de solutions d'extraction et de séparation de molécules. Au cours de l'année 2011, l'entreprise a développé un procédé innovant de séparation et de purification fractionnée de biomolécules issues de macroalgues marines. Ce travail de thèse a pour objectif de trouver des applications aux fractions extraites selon le procédé d'extraction et de purification de la société SEPROSYS, et en particulier la fraction des polysaccharides sulfatés, dans deux domaines distincts : en pharmaceutique pour leur activité anti-coagulante et en cosmétique pour leur activité anti-âge. La première partie de nos travaux se penche sur le potentiel des polysaccharides sulfatés de macroalgues comme anti-coagulants. Pour cela, des extraits aqueux de différentes macroalgues brunes, rouges et vertes ont été préparés et leur activité anti-coagulante a été mesurée. Les algues présentant le meilleur potentiel ont ensuite été traitées au-moyen du procédé SEPROSYS[®] afin de purifier leurs polysaccharides sulfatés et d'étudier leur activité anti-coagulante. De plus, l'objectif de ce travail consiste également à mieux comprendre la relation structure-fonction de l'activité anticoagulante d'ulvanes. A cette fin, des ulvanes issus d'*Ulva sp.* de pureté élevée ont été produits par le procédé SEPROSYS[®], soumis à des modifications chimiques (hypersulfatation) et physique (dépolymérisation) et leur activité anticoagulante a été étudiée. La deuxième partie de nos travaux concerne l'évaluation du potentiel de ces macroalgues comme agents actifs utilisables en dermo-cosmétique, en particulier pour leur activité anti-âge. Dans ce but, différentes fractions de macroalgues brunes, rouges et vertes ont été testées sur des lignées cellulaires de fibroblastes dermiques humains et leur effet sur la production de collagène par ces fibroblastes a été étudié. Enfin, le potentiel d'ulvanes extraits d'*Uva sp.* par le procédé de l'entreprise SEPROSYS pour stimuler la biosynthèse de collagène et d'acide hyaluronique par ces mêmes fibroblastes a été déterminé.

Mots clés : macroalgues marines, extraction et purification, polysaccharides sulfatés, ulvanes, anti-coagulants, sulfatation, dépolymérisation, dermo-cosmétique anti-âge, collagène, acide hyaluronique, fibroblastes

Pilote-scale production of sulfated polysaccharides from marine macroalgae for their anti-coagulant and anti-aging cosmetics activities

Abstract:

SEPROSYS is a company specialized in the development of solutions for the extraction and separation of molecules. In 2011, the company has developed an innovative process of fractionated separation and purification of biomolecules from macroalgae. The purpose of this thesis work is to find applications for the purified fractions from the SEPROSYS[®] process and in particular the sulfated polysaccharides, for two distinct biological activities: as pharmaceutical for their anti-coagulant activity and as dermo-cosmetics for their anti-aging activity. The first part of our work focus on the potential of sulfated polysaccharides from macroalgae as anti-coagulant agents. To this end, aqueous extracts from brown, red and green macroalgae were prepared and their anti-coagulant activity was measured. The best macroalgae were then processed with the SEPROSYS procedure in order to purify the sulfated polysaccharides and study their activity. Furthermore, one of the objectives of this work was to acquire a better understanding of the structure/anti-coagulant function relationship of ulvans. Ulvans of high purity were extracted from *Ulva sp.* with the SEPROSYS[®] process, submitted to chemical (hypersulfatation) and physical (depolymerization) modifications and their anti-coagulant activity was measured. The second part of our work relates to the potential of the macroalgae as active agents to be used in dermo-cosmetics, and, in particular, for their anti-aging activity. Different brown, red and green macroalgae fractions were thus tested on normal human dermal fibroblasts cell lines and their effects on the collagen production were measured. Furthermore, the capacity of different molecular weight ulvans extracted from *Ulva sp.* to stimulate the collagen and hyaluronan biosynthesis was studied. To this end, we developed an efficient depolymerization procedure using ion exchange resins.

Key-words: marine macroalgae, extraction and purification, sulfated polysaccharides, ulvans, anti-coagulants, sulfation, depolymerization, anti-aging dermo-cosmetics, collagen, hyaluronan, fibroblasts

