



**HAL**  
open science

# Conception et optimisation d'oligosaccharides de lambda-carraghénanes et de fucoïdanes à visée anti-cancéreuse

Chanez Manseur

► **To cite this version:**

Chanez Manseur. Conception et optimisation d'oligosaccharides de lambda-carraghénanes et de fucoïdanes à visée anti-cancéreuse. Chimie analytique. La Rochelle Université, 2024. Français. NNT : . tel-04836856

**HAL Id: tel-04836856**

**<https://hal.science/tel-04836856v1>**

Submitted on 13 Dec 2024

**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.



Open licence - etalab



# LA ROCHELLE UNIVERSITÉ

ÉCOLE DOCTORALE

*EUCLIDE*

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) CNRS UMR 7266 -ULR

Equipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS)

THÈSE

Soutenue par :

**Chanez MANSEUR**

Le 17/05/2024

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Chimie des substances naturelles

## **Conception et optimisation d'oligosaccharides de lambda-carraghénanes et de fucoïdanes à visée anti-cancéreuse**

### **JURY :**

Mr Guillaume PIERRE	MCU HDR, CNRS, UMR 6602, Université Clermont Auvergne – Rapporteur de thèse
Mme Mirjam CZJEK	DR, CNRS, UMR 8227, Sorbonne Université- Station Biologique de Roscoff – Rapporteur de thèse
Mme Nathalie FAUMONT	PR-U, équipe CRIBL, CNRS, UMR 7276 INSERM 1262 Université de Limoges – Examinatrice
Mme Gabrielle POTOCKI-VERONESE	DR, UMR 5504, INRAE 792, Université de Toulouse – Examinatrice, Présidente du Jury
Mr Jean-Marie PIOT	Pr. émérite, CNRS, UMR 7266, LIENSs, La Rochelle Université – Examineur
Mme Ingrid ARNAUDIN	Pr. CNRS, UMR 7266, LIENSs, La Rochelle Université – Co-directrice de thèse
Mr Thierry MAUGARD	Pr. CNRS, UMR 7266, LIENSs, La Rochelle Université – Co-directeur de thèse
Mr Hugo GROULT	CR, CNRS, UMR 7266, LIENSs, La Rochelle Université – Encadrant scientifique de thèse



*« La persévérance, c'est ce qui rend l'impossible possible,  
le possible probable et le probable certain ».*

*Robert Half*



## Remerciements

Ce projet de thèse a été réalisé grâce au financement du comité départemental de Charente-Maritime de La ligue Contre le Cancer présidé par le Pr. Jean-Marie Piot. J'exprime ma profonde reconnaissance à l'ensemble des donateurs pour leur bienveillance, générosité, et confiance.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail en acceptant de l'évaluer.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe Biotechnologie et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS) du laboratoire LIENSs UMR 7266 CNRS-ULR dirigé par Mme Valerie Ballu, que je remercie pour m'avoir accueillie dans cette structure.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, le Pr Ingrid Arnaudin Fruitier et le Pr Thierry Maugard, pour leur confiance, leurs précieux conseils, leurs soutiens, et de m'avoir accordé le temps qu'il me fallait pour la concrétisation de ce projet. Je les remercie également d'avoir veillé à la disponibilité de toutes les ressources nécessaires pour la réalisation des travaux.

À toi Hugo, le meilleur des encadrants. Ces lignes ne suffiront jamais pour t'exprimer ma reconnaissance, car je pense qu'il faudrait tout un livre, mais je vais quand même tenter. Merci pour ta disponibilité, ton accompagnement, ta bienveillance, ton soutien, ta gentillesse, et pour tout ce que tu as apporté, tout au long de ces années de thèse. Merci d'avoir été là dans les hauts et les bas. Tes conseils ont toujours été précieux et m'ont permis d'évoluer à la fois scientifiquement et personnellement. Ce fut un plaisir de travailler avec toi, toujours dans la bonne humeur, et j'espère avoir plein d'autres opportunités.

Un grand merci à Rachida et à Oussama. Vous avez tout le temps été là pour moi durant ma thèse, et j'en suis tellement reconnaissante. J'ai énormément apprécié travailler avec toi Rachida, et surtout faire des tests héparanase qui parfois tournaient au zgougou, mais grâce à toi, tout allait bien. Merci à vous deux pour vos relectures et corrections, et surtout pour votre générosité. Merci également à Salima et à Youssef que j'adore tellement.

---

Jennifer, je tiens à te dire merci pour ta présence, ton aide, ta compagnie, et ton encouragement. Tu as été tout le temps disponible pour répondre à mes questionnements. Je te remercie également pour toutes les relectures et corrections. J'ai été très ravie de travailler avec toi. J'ai gagné à la fois une bonne collègue de travail et une très bonne amie.

Je remercie énormément Pierre Edouard, Nicolas Bridiau, Valerie Thiéry, Kévin, Carine, et Florian, d'avoir consacré du temps pour répondre à mes questions.

Je remercie également les deux stagiaires Samir et Raphaëlle d'avoir contribué à l'avancement de ce projet de thèse.

Rémi, merci à toi de m'avoir très bien accueillie à mon arrivée, et d'avoir toujours pris de mes nouvelles.

Julien et Béatrice, merci à vous pour le bon délire, le soutien, et tous les bons conseils.

Camille Caminou, j'ai apprécié toutes les petites discussions pendant tes passages à mon bureau. J'espère que lorsque tu liras ça, Kiko aura déjà ouvert !!!

Manon, merci à toi pour toutes les bonnes idées que tu proposais durant les réunions de la Nanoteam, qui ont beaucoup fait avancer.

Un énorme merci pour mon collègue Michel, pour sa bienveillance, son soutien, et tous les échanges enrichissants partagés.

Merci à mes collègues, Benjamin, Clément, Maelenn, Rachel, Julia, Maeva, Leïla, Luiz, Alma, Jonathan, Haya, Marie, et Maria, pour leurs soutiens.

Je tiens également à remercier Isabelle, Sophie, Stéphanie, Laurent, et Jean-René, pour leurs encouragements.

---

J'adresse mes remerciements à Valérie Sopena et à Thierry Nicolas, pour leurs soutiens, bonne humeur, et leur aide en salle TP.

Je remercie vivement le personnel administratif du laboratoire LIENSs et de l'école doctorale, Laetitia Frappier, Johan Guiard, et Isabelle Hirsch, d'avoir toujours facilité toutes les tâches administratives.

Mes chères amies Kahina et Samia, merci pour tous les bons moments que nous avons partagés en Belgique, et pour tout le soutien que vous m'avez apporté.

Mon cher ami Laudhey, merci pour ta présence tout au long de mes années d'étude. Ta positivité contagieuse m'a beaucoup aidée.

Ma chère Kenza, ma merveilleuse amie, merci pour tous les fous rires qui ne se sont jamais arrêtés depuis le collège.

Amal, ma chère amie, je ne pourrai jamais te remercier assez pour ton énorme soutien et ta bienveillance.

Hanane, ma chère amie, nous avons commencé notre aventure en France ensemble en restant toujours soudées. Ton amitié m'a beaucoup apportée, et je te remercie infiniment d'avoir toujours cru en moi.

Mina, à toi ma meilleure amie, avec qui je partage les délires les plus fous. Merci pour le soutien que tu m'apportes quotidiennement, même si c'est très compliqué d'avoir une conversation sérieuse. Merci pour cette merveilleuse amitié.

Enfin, je termine ces remerciements par ma chère famille. Mama et Papa que j'aime le plus au monde, ma sœur Melissa ma moitié, mon petit Prince Samy, Thanina, et tous mes chers frères. Merci d'avoir cru en moi, et merci pour votre amour. Cette thèse est aussi la vôtre ! Je n'ai pu mener ce parcours et l'aboutir que grâce à votre confiance et votre soutien indéfectible. Un grand merci également à mes chers oncles et tantes de m'avoir soutenue depuis le départ.

---

---

## Publications et communications scientifiques

### PUBLICATIONS DE RANG A

- ACCEPTÉES

[1] **Manseur, C.**; Groult, H.; Porta, M., Bodet, P.-E.; Mersni-Achour, R.; Petit, R.; Ali-Moussa, S.; Musnier, B.; Le Cerf, D.; Varacavoudin, T.; Haddad, O.; Sutton, A.; Leal, C. E. Y.; Alencar-Filho, E. B.; Piot, J.-M.; Bridiau, N.; Maugard, T.; and Fruitier-Arnaudin, I. A Screening Approach to Assess the Impact of Various Commercial Sources of Crude Marine  $\lambda$ -Carrageenan on the Production of Oligosaccharides with Anti-heparanase and Anti-migratory Activities. *Mar. Drugs* **2023**, 21, 295.

[2] Saliba, J.; **Manseur, C.**; Groult, H.; Akil, H.; Tannoury, M.; Troutaud, D.; Maugard, T.; Feuillard, J.; Arnaudin, I.; and Jayat-Vignoles, C. Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic vLMW Fucoidan Formulas Decrease PD-L1 Surface Expression in EBV Latency III and DLBCL Tumoral B-Cells by Decreasing Actin Network, *Mar Drugs* **2023**, 21,132.

[3] Cousin, R.; Groult, H.; **Manseur, C.**; Ferru-Clément, R.; Gani, M.; Havret, R.; Toucheteau, C.; Prunier, G.; Colin, B.; Morel, F.; Piot, J.-M.; Lanneluc, I.; Baranger, K.; Maugard, T.; and Fruitier-Arnaudin, I. A Marine  $\lambda$ -Oligocarrageenan Inhibits Migratory and Invasive Ability of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells through Actions on Heparanase Metabolism and MMP-14/MMP-2 Axis. *Mar. Drugs* **2021**, 19, 546.

- EN RÉDACTION

[1] **Manseur, C.**; Saliba, J.; Mersni-Achour, R.; Colin, B.; Musnier, B.; Ali-Moussa, S.; Bodet, P.-E.; Bridiau, N.; Le Cerf, D.; Varacavoudin, T.; Piot, JM.; Maugard, T.; Groult, H\*.; Arnaudin, I\*. Structure-function insights on fucoïdan oligosaccharides production with anti-heparanase and anti-migratory activities (journal non défini).

---

**COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES** (Nom souligné : présenté par)

- ORALES en congrès internationaux (5) et nationaux (2)

[1] Porta Zapata, M.; Carregal-Romero, S.; Daviaud, C.; Martínez-Parra, L.; Ferrer, D.; Urkola-Arsuaga, A.; **Manseur, C.**; Piot, J.-M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Ruíz-Cabello, J.; Groult, H. Application of  $\lambda$ -Carrageenan oligosaccharides as innovative sugar-based biofunctional coating for theranostic ferrite nanoparticles. **ICONAN 2024, Barcelona, Spain, 15-17 janvier 2024.**

[2] Porta, M.; Carregal-Romero, S.; Daviaud, C.; Martínez-Parra, L.; Castejon-Ferrer, D.; Urkola-Arsuaga, A.; **Manseur, C.**; Piot, J.-M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Ruíz-Cabello, J.; Groult, H. Bioactive  $\lambda$ -Carrageenan oligosaccharides coated ferrite nanoparticles as potential anticancer nanodrugs. **20èmes journées du Canceropôle Grand Ouest, Arcachon, France, 22-24 novembre 2023.**

[3] Daviaud, C.; Havret, R.; **Manseur, C.**; Porta, M.; Musnier, B.; Cousin, R.; Main, H.; Groult, H.; Maugard, T.; Morel, F.; Arnaudin, I.; Baranger, K. An original oligosaccharide with anti-inflammatory activities. **Proteocure's Annual meeting, Zagreb, Croatie, 12-15 Juin 2023.**

[4] Daviaud, C.; Havret, R.; **Manseur, C.**; Porta, M.; Musnier, B.; Cousin, R.; Main, H.; Groult, H.; Maugard, T.; Morel, F.; Arnaudin, I.; Baranger, K. An original oligosaccharide as inhibitor of heparanase 1 activity and anti-inflammatory activities. **Webinaire Franco-Brazilian Network on Natural Products FB2NP, La Rochelle, France, 11-12 juillet 2022.**

[5] Saliba J.; **Manseur, C.**; Gressein C.; Groult, H.; Akil H.; Tannoury M.; Troutaud D.; Feuillard J.; Arnaudin I.; Jayat-Vignoles C. Role of fucoidans in the restoration of the anti-tumor T-cell response inhibited by EBV latency III B cells *via* the PD-L1 immune checkpoint. **20th International EBV symposium, Sienne, Italie, 3-6 juillet 2022.**

[6] **Manseur, C.**; Cousin, R.; Daviaud, C.; Baranger, K.; Plissonier, D.; Groult, H.; Maugard, T.; Arnaudin, I. Conception et optimisation d'oligosaccharides marins sulfatés pharmacomodulateurs de la progression tumorale. **Colloque des doctorants de 2ème année à la Rochelle Université, La Rochelle, France, 5 mai 2022.**

---

[7] **Manseur, C.;** Groult, H.; Cousin, R.; Saliba, J.; Vignoles, C.; Colin, B.; Piot, J.; Maugard, T.; Arnaudin, I. Preparation of bioactive  $\lambda$ -carrageenan and Fucoïdan oligosaccharides containing anti-tumor activities. **7e congrès international EPNOE (European Polysaccharide Network Excellence), Nantes, France, 11-15 Octobre 2021.**

- AFFICHÉS en congrès internationaux (3) et nationaux (3)

[1] **Saliba, J.; Manseur, C.;** Porta, M.; Feuillard, J.; Jayat-Vignoles, C.; Maugard, T.; Groult, H.; Arnaudin, I. Marine fucoïdan oligosaccharides as promising multi-tasking formulations in cancer therapy. **20 ème journée du Canceropôle Grand Sud-Ouest, Arcachon, France, 22-24 Novembre 2023.**

[2] **Daviaud, C.;** Havret, R.; **Manseur, C.;** Porta, M.; Musnier, B.; Cousin, R.; Main, H.; Groult, H.; Maugard, T.; Morel, F.; Arnaudin, I.; Baranger, K. An original oligosaccharide with anti-inflammatory activities. **Proteocure's Annual meeting, Zagreb, Croatie, 12-15 Juin 2023.**

[3] **Porta, M.;** Carrega-Romero, S.; Daviaud, C.; Martinez-Parra, L.; Urkola-Arsuaga, A.; **Manseur, C.;** Piot, J-M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Ruiz-Cabello, J.; Groult, H. Bioactive  $\lambda$ -carrageenan oligosaccharides coated Mn-doped iron oxide nanoparticles as potential anticancer nanodrugs. **European Molecular Imaging Meeting, Salzburg, Autriche, 14-17 mars 2023.**

[4] **Daviaud, C.;** **Manseur, C.;** Porta, M.; Musnier, B.; Cousin, R.; Main, H. Groult, H.; Maugard, T.; Morel, F.; Fruitier-Arnaudin, I.; Baranger, K. An original oligosaccharide as inhibitor of heparanase 1 activity and anti-inflammatory activities. **Congrès annuel de la SFBBM, Paris, 4-5 juillet 2022.**

[5] **Saliba, J.;** **Manseur, C.;** Groult, H.; Akil, H.; Tannoury, M.; Troutaud, D.; Feuillard, J.; Arnaudin, I.; Jayat-Vignoles, C. The EBV latency III tumoral B cell model allow to point fucoïdane as a potential adjuvant of anti-PD-L1 immunotherapy. **Immune Responses in Cancer and Infection (IRCI), Lyon, France, 15-17 Juin 2022.**

---

[6] **Manseur, C.**; Cousin, R.; Daviaud, C.; Baranger, K.; Plissonier, D.; Groult, H.; Maugard, T.; Arnaud, I. Conception et optimisation d'oligosaccharides marins sulfatés pharmacomodulateurs de la progression tumorale. **Colloque des doctorants de 2ème année à la Rochelle université, La Rochelle, France, 5 Mai 2022.**

## **Formations validées par l'école doctorale**

- Spectrométrie de masse haute résolution
- Microscopie électronique à balayage
- Intégrité scientifique
- Propriété intellectuelle
- Recherche bibliographique
- Anglais oral et écrit

## **Enseignements**

- Travaux dirigés en biochimie structurale : 15 heures (première année de licence)
  - Travaux pratiques en techniques électrophorétiques : 38 heures (deuxième année de licence)
-

# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>2</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des équations</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des annexes</b> .....	<b>10</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>12</b>
<b>Partie 1 : Étude bibliographique</b> .....	<b>26</b>
<b>1. Généralités sur les polysaccharides d'origine algale</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Les polysaccharides natifs d'origine algale de l'étude</b> .....	<b>32</b>
2.1. Les carraghénanes (CARs).....	32
2.2. Les fucoïdanes.....	36
2.3. Les méthodes d'extraction et de purification des CARs et des fucoïdanes .....	39
2.4. Les facteurs impactant la diversité structurale des CARs et des fucoïdanes .....	44
2.5. Les méthodes d'obtention des $\lambda$ -COs et des F-Os.....	51
2.6. Les méthodes de purification des $\lambda$ -COs et des F-Os.....	64
<b>3. Les <math>\lambda</math>-COs et F-Os thérapeutiques en oncologie (hors cible HPSE)</b> .....	<b>68</b>
3.1. Activités anti-cancéreuses des $\lambda$ -COs.....	68
3.2. Activités anti-cancéreuses des F-Os.....	75
<b>4. L'inhibition de l'héparanase (HPSE), un phénotype d'intérêt à cibler</b> .....	<b>81</b>
4.1. Généralités sur l'HPSE.....	81
4.2. Le mode d'action de l'héparanase .....	82
4.3. Le rôle de l'héparanase dans la progression tumorale .....	83
4.4. Les inhibiteurs de l'héparanase d'origine algale .....	86
<b>Problématiques et objectifs de la thèse</b> .....	<b>98</b>
<b>Partie 2 : Matériels et méthodes</b> .....	<b>102</b>
<b>1. Les polysaccharides d'origine algale de la thèse : <math>\lambda</math>-CARs et fucoïdane</b> .....	<b>103</b>
<b>2. Méthodologie de production des <math>\lambda</math>-COs et des F-Os</b> .....	<b>103</b>
<b>3. Caractérisations structurales</b> .....	<b>104</b>
3.1. Détermination des poids moléculaires par HPSEC-MALS et par HPSEC-DRI .....	104

---

3.2.	Détermination du degré de sulfatation (DS) par ICP-MS et par un test à l'Azure A .....	107
3.3.	Dosage des sucres réducteurs par WST-1 .....	107
3.4.	Analyses par FT-IR .....	108
3.5.	Analyses par UPLC-MS.....	108
3.6.	Analyses par RMN .....	110
<b>4.</b>	<b>Evaluation des activités biologiques .....</b>	<b>110</b>
4.1.	Mesure de l'activité anti-coagulante par coagulométrie.....	110
4.2.	Mesure de l'inhibition de l'activité de l'HPSE par un test enzymatique basé sur le FRET .....	111
4.3.	Evaluation des activités anti-cancéreuses.....	112
<b>5.</b>	<b>Analyses statistiques.....</b>	<b>116</b>
<b>6.</b>	<b>Résumé graphique.....</b>	<b>117</b>
<b>Partie 3 : Résultats et discussions .....</b>		<b>118</b>
<b>Chapitre 1 : Conception et optimisation d'oligosaccharides de <math>\lambda</math>-carraghénanes à visée anti-cancéreuse.....</b>		<b>120</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>121</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats et discussions .....</b>	<b>122</b>
2.1.	Estimation des grandeurs caractéristiques de base et caractérisation structurale des $\lambda$ -CARs natifs 122	
2.2.	Dépolymérisation des $\lambda$ -CARs natifs pour la production de $\lambda$ -COs.....	123
2.3.	Etude de l'inhibition de l'HPSE par les $\lambda$ -COs .....	125
2.4.	Caractérisation structurale par UHPLC-MS et RMN des $\lambda$ -COs sélectionnés .....	127
2.5.	Activité anti-migratoire des $\lambda$ -COs sur les cellules d'hépatocarcinome de la lignée Huh7 .....	130
<b>Chapitre 2 : Conception et optimisation d'oligosaccharides de fucoïdanes à visée anti-cancéreuse.....</b>		<b>133</b>
<b>Section 1- Oligosaccharides de fucoïdanes inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'héparanase et de la migration.....</b>		<b>133</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>134</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats et discussions .....</b>	<b>135</b>
2.1.	Dépolymérisation du fucoïdane natif et détermination des caractéristiques moléculaires de base des F-Os produits.....	135
2.2.	Caractérisation structurale par UPLC-MS.....	139
2.3.	Caractérisation structurale par FT-IR.....	146
2.4.	Criblage des activités biologiques <i>in vitro</i> .....	149
2.5.	Criblage des activités biologiques <i>in cellulo</i> .....	154

---

<b>Section 2- Oligosaccharides de fucoïdanes régulateurs de l'expression du point de contrôle</b>	
<b>PD-L1 .....</b>	<b>160</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>161</b>
<b>2. Résultats et discussions .....</b>	<b>162</b>
2.1. Conception et caractérisation structurale des formulations de fucoïdane de très bas poids moléculaire (tBPM-F).....	162
2.2. Inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose dans les cellules B tumorales .....	162
2.3. Effets sur PD-L1 à travers la destruction du réseau d'actine .....	163
2.4. Structure-fonction et comparaison des résultats .....	164
<b>Partie 4 : Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>166</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>178</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>184</b>

---



# Liste des abréviations

<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>HSPG</b> : HS protéoglycanes
<b>APTT</b> : temps de céphaline activée	<b>HPLC</b> : Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>HPM</b> : haut poids moléculaire
<b>BPM</b> : bas poids moléculaire	<b>HPSE</b> : héparanase
<b>BPF</b> : bonnes pratiques de fabrication	<b>HPSEC-DRI</b> : chromatographie d'exclusion stérique haute pression avec un détecteur d'indice de réfraction
<b>BPL</b> : bonnes pratiques de laboratoire	<b>HPSEC-MALS</b> : chromatographie d'exclusion stérique haute pression avec diffusion de lumière multi angles
<b>CARs</b> : carraghénanes	<b>IdoA</b> : acide iduronique
<b>CAZy</b> : carbohydre active enzymes	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> : interféron gamma
<b>DO</b> : densité optique	<b>IUPAC</b> : International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>EBV</b> : virus d'Epstein Barr	<b>KCl</b> : chlorure de potassium
<b>CR</b> : carraghénanes raffinés	<b>LMWF</b> : low molecular weight fucoidan
<b>CSR</b> : carraghénanes semi raffinés	<b>MEC</b> : matrice extracellulaire
<b>CTC</b> : cellules tumorales circulantes	<b>MET</b> : microenvironnement tumoral
<b>DP</b> : degré de polymérisation	<b>MIA</b> : matière insoluble en acide
<b>DS</b> : degré de sulfatation	<b>MMP</b> : métalloprotéinases
<b>EGF</b> : epidermal growth factor	<b>MMWF</b> : middle molecular weight fucoidan
<b>FDA</b> : Food and Drug Administration	<b>MS</b> : spectrométrie de masse
<b>FGF</b> : fibroblast growth factor	<b>OS</b> : oligosaccharides
<b>F-Os</b> : oligosaccharides de fucoïdanes	<b>PCA</b> : analyse en composantes principales
<b>FRET</b> : transfert d'énergie par résonance de fluorescence	<b>PD-L1</b> : programmed death ligand-1
<b>FT-IR</b> : analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	<b>PM</b> : poids moléculaire
<b>GAG</b> : glycosaminoglycanes	<b>PS</b> : polysaccharides
<b>GH</b> : glycoside hydrolase	<b>RMN</b> : résonance magnétique nucléaire
<b>GclA</b> : acide glucuronique	
<b>GlcN</b> : glucosamine	
<b>HCl</b> : acide chlorhydrique	
<b>HMWF</b> : high molecular weight fucoidan	
<b>HS</b> : héparanes sulfates	
<b>HSBP</b> : HS binding proteins	

**TEM** : transition épithelio-mésenchymateuse

**TFA** : acide trifluoroacétique

**TGF** : transforming growth factor

**TNBC**: cancer du sein triple négatif

**TNF- $\alpha$** : tumour necrosis factor alpha

**TT** : temps de thrombine

**UPLC-MS**: spectrométrie de masse en tandem par chromatographie ultra-performante

**vBPM-F** : F-Os de très BPM

**VEGF**: vascular endothelial growth factor

**$\iota$ -COs**: OS de  $\iota$ -CARs

**$\kappa$ -COs**: OS de  $\kappa$ -CARs

**$\lambda$ -COs**: OS de  $\lambda$ -CARs

**5-Fu** : 5 fluorouracile

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Position des macro-algues et des plantes supérieures dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes.....	28
<b>Figure 2.</b> Classification des polysaccharides et leur organisation au sein de l'algue.....	29
<b>Figure 3.</b> Propriétés biologiques des PS sulfatés d'origine algale.....	31
<b>Figure 4.</b> Structures chimiques des familles de CARs classées en fonction de la position des groupements sulfates sur l'unité <b>G</b> du disaccharide de galactopyranose.....	33
<b>Figure 5.</b> Structure du fucoïdane de type I et de type II.....	37
<b>Figure 6.</b> Les différents processus appliqués pour l'extraction des CARs et des fucoïdanes .	40
<b>Figure 7.</b> Cycle de reproduction de l'algue rouge <i>Chondrus crispus</i> ( <i>Gigartinaceae</i> ) avec les structures dominantes de CARs en fonction de la phase. ....	44
<b>Figure 8.</b> Diagramme de Stancioff .....	46
<b>Figure 9.</b> Organisation de la paroi des algues rouges .....	47
<b>Figure 10.</b> Schéma récapitulatif des méthodes de conception d'oligosaccharides sulfatés. ...	52
<b>Figure 11.</b> Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides.....	53
<b>Figure 12.</b> Mécanisme de la dépolymérisation radicalaire des PS .....	56
<b>Figure 13.</b> Mécanisme général de coupure des glycosides hydrolases par inversion .....	60
<b>Figure 14.</b> Mécanisme général de coupure des glycosides hydrolases par rétention.....	61
<b>Figure 15.</b> Mécanisme général de la synthèse chimique d'oligosaccharides.....	62
<b>Figure 16.</b> Mécanisme général de la synthèse enzymatique d'oligosaccharides.....	64
<b>Figure 17.</b> Schéma récapitulatif des principales techniques appliquées à la purification des $\lambda$ -COs et des F-Os, avec leurs avantages et inconvénients.....	66
<b>Figure 18.</b> Le mode d'action de l'HPSE sur son substrat naturel l'HS.....	82
<b>Figure 19.</b> Schéma récapitulatif de processus tumoraux clés favorisés par l'HPSE dans le microenvironnement tumoral .....	84
<b>Figure 20.</b> Structures chimiques des inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'HPSE d'origine algale .....	87
<b>Figure 21.</b> Résumé graphique de la démarche expérimentale.....	117
<b>Figure 22.</b> Dépolymérisation radicalaire du fucoïdane natif commercial (de l'espèce <i>Fucus vesiculosus</i> ) en appliquant un ratio H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /fucoïdane natif de 0,15 ou de 0,5 .....	135
<b>Figure 23.</b> Profils chromatographiques de l'UPLC-MS des formulations F-Os.....	139

<b>Figure 24.</b> Structure développée avec les fragmentations inter- et intra- cycliques en MS/MS .....	141
<b>Figure 25.</b> Signal d'intensité du fucose sulfaté et de la fuconosyl-fuconolactone en fonction de la diminution du $M_n$ et du ratio de $H_2O_2$ /fucoïdane natif appliqué. ....	143
<b>Figure 26.</b> Traitements des signaux des chromatogrammes par soustraction du F-O 24h de la série 0,15 par le F-O 8h de la série 0,5 ; et inversement. ....	144
<b>Figure 27.</b> Spectres FT-IR du fucoïdane natif et des formulations F-Os .....	146
<b>Figure 28.</b> Evaluation de l'activité anti-coagulantes des F-Os.....	150
<b>Figure 29.</b> Evaluation de l'inhibition de l'activité enzymatique de la HPSE des F-Os.. .....	152
<b>Figure 30.</b> Evaluation de l'effet des formulations F-Os sur la viabilité des cellules MDA-MB-231.....	154
<b>Figure 31.</b> Evaluation de l'activité anti-migratoire des formulations F-Os sélectionnées sur les cellules MDA-MB-231 après 24h de traitement. ....	157
<b>Figure 32.</b> Schéma récapitulatif des défis traités durant les travaux de thèse (cadres bleus), et de quelques exemples de perspectives envisageables (cadres rouges).....	168

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Liste et localisation de quelques espèces d'algues rouges productrices des principaux CARs .....	32
<b>Tableau 2.</b> Quelques exemples de la nomenclature des CARs basée sur les codes à lettres ..	35
<b>Tableau 3.</b> Composition en CARs de diverses algues en fonction de la saison de récolte .....	48
<b>Tableau 4.</b> Exemples de méthodes appliquées à la purification de COs et de F-Os. ....	67
<b>Tableau 5.</b> Récapitulatif des études portant sur les $\lambda$ -COs dans le cancer .....	73
<b>Tableau 6.</b> Quelques exemples d'études réalisées sur les F-Os dans le cancer .....	79
<b>Tableau 7.</b> Récapitulatif des études réalisées sur les $\lambda$ -CARs et fucoïdanes natifs, ainsi que leurs OS respectifs dans le cancer en lien avec l'HPSE.....	95
<b>Tableau 8.</b> Conditions des contrôles de migration sur les cellules MDA-MB-231. ....	115
<b>Tableau 9.</b> Masses molaires ( $M_n$ et $M_w$ ), degré de dépolymérisation moyen en nombre (DP), et indice de polydispersité ( $\mathfrak{D}$ ) calculés par des analyses en HPSEC-MALS ou en HPSEC-DRI et degré de sulfatation (DS) du fucoïdane natif et de l'ensemble des formulations de F-Os.....	136
<b>Tableau 10.</b> Identification moléculaire des structures détectées dans les formulations de F-Os .....	140



## Liste des équations

<b>Équation 1.</b> Formule de calcul de la masse molaire moyenne pondérée en nombre ( $M_n$ )... 105
<b>Équation 2.</b> Formule de calcul de la masse molaire moyenne pondérée en masse ( $M_w$ )..... 105
<b>Équation 3.</b> Formule de calcul de l'indice de polydispersité ( $\mathcal{D}$ ). ..... 105
<b>Équation 4.</b> Formule de calcul du degré de polymérisation (DP)..... 105
<b>Équation 5.</b> Formules de calcul de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE. .... 112
<b>Équation 6.</b> Formule de calcul de la viabilité cellulaire..... 114
<b>Équation 7.</b> Formule de calcul de la migration cellulaire. .... 116



## Liste des annexes

<b>Annexe 1.</b> Spectre MS/MS de l'ion 890,1303 à un $t_r= 9'9$ correspondant à un trifucose tetrasulfaté.....	180
<b>Annexe 2.</b> Dosage des amines libres dans la solution de fucoïdane natif par le test colorimétrique d'acide sulfonique 2,4,6-Trinitrobenzène (TNBS).....	180
<b>Annexe 3.</b> Comparaison des spectres FTIR des formulations de F-O 24h et de F-O 8h des séries 0,15 et 0,5 ; respectivement.....	181
<b>Annexe 4.</b> IC <sub>50</sub> de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE par la formulation de F-O 72h de la série 0,15, la formulation de F-O 12h de la série 0,5, et par le fucoïdane natif.....	181
<b>Annexe 5.</b> Pourcentage d'inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231 par les formulations de F-Os.....	182
<b>Annexe 6.</b> Effet du traitement par le $\lambda$ -CO (à 100 $\mu$ g/mL, pendant 48h) sur l'expression membranaire de PD-L1 par les lymphocytes B en latence III de l'EBV.....	183



## **Introduction générale**

Le cancer est l'une des maladies les plus graves à laquelle la recherche médicale reste confrontée. Il reste l'une des principales causes de décès dans le monde, avec plus de 9,6 millions de morts en 2018 [1]. Les traitements actuels tels que les chimiothérapies agissent à travers l'arrêt du cycle cellulaire afin de limiter la prolifération des cellules cancéreuses. Malheureusement, en plus d'un manque de spécificités avec ces traitements, la dose délivrée effective dans les tissus tumoraux est minime, ce qui engendre des effets secondaires toxiques et un développement de résistance pouvant conduire à la récurrence de la maladie et au décès du patient [2,3]. Puisqu'il est admis que l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases apparaissent comme les deux processus les plus difficiles à corriger [4,5], il est donc indispensable de poursuivre les efforts dans la conception, l'identification et l'évaluation de nouveaux agents anticancéreux. Par conséquent, **la recherche de nouvelles sources de molécules anti-cancéreuses plus spécifiques, entrant dans des stratégies efficaces pour contrer la toxicité de la chimiothérapie et de la radiothérapie, devient une urgence de santé publique.**

Durant ces dernières années, l'écosystème marin, par son exceptionnelle biodiversité, attire considérablement l'attention dans cette recherche de nouvelles molécules à usage anticancéreux. Dans cet écosystème, les macroalgues marines sont considérées comme une des sources non-animales les plus riches en molécules bioactives [6]. De plus, nous observons à l'échelle nationale comme à l'échelle européenne un dynamisme remarquable engagé par les politiques publiques pour libérer le potentiel des algues en Europe (« Towards a Strong and sustainable EU Algae Sector »). Cela devrait contribuer à la réalisation des objectifs de nombreux programmes européens (par exemple : « Global Seaweed Coalition » et « European Algae Biomass Association »), pour qu'à l'horizon 2030, les algues en Europe ne soient plus considérées comme une filière de niche mais comme une filière pourvoyeuse de produits innovants à mettre sur le marché, dans la gamme la plus large possible d'applications.

**Quand on s'intéresse au domaine des substances algales bioactives, les polysaccharides (PS) sont comptés parmi celles les plus étudiées dans ce cadre [6–8].** En effet, ils sont connus pour leurs multiples bioactivités, et contrairement à ceux d'origine animale, ils ne sont pas confrontés à des problèmes éthiques et offrent une disponibilité en large abondance [6]. Les PS sont des bio-polymères complexes riches en groupements fonctionnels (amines, éthers, sulfates, carboxyles, carbonyles, hydroxyles) [9,10]. Dans l'homéostasie de

l'algue, ils lui confèrent notamment des propriétés structurales et fonctionnelles indispensables. Par exemple, en tant que molécules réserves d'énergie, ou de supports d'interface pour de nombreuses interactions moléculaires et cellulaires [6,11].

Du fait de leurs propriétés physicochimiques et biologiques, les PS d'origine algale sont avant tout utilisés par les industries de l'agroalimentaire (comme agents texturants, compléments alimentaires, etc) [12], de la dermocosmétique [13,14], ou encore dans le traitement des effluents industriels [9,15]. Ils occupent également une petite partie de l'industrie biomédicale, à travers leurs utilisations comme excipients dans les formulations de médicaments et de vaccins (pour améliorer leurs efficacités) [9,15,16], dans les dispositifs médicaux ou encore dans les formulations de cicatrisation et de régénération tissulaire [17,18]. La recherche pharmaceutique quant à elle, s'intéresse au large spectre de leurs bioactivités (anti-oxydantes, immunomodulatrices, anti-coagulantes, anti-tumorales, etc) [6,8,18–21]. Dans le domaine de la cancérologie, ils sont particulièrement étudiés par rapport à de nouveaux modes d'action anti-tumoraux (capacité à cibler ou à moduler des métabolismes procancéreux au sein du microenvironnement tumoral (MET)), et à des actions anti-tumorales plus classiques (induction de l'apoptose, arrêt du cycle cellulaire, suppression de l'angiogenèse et des métastases) mais qui semblent cibler spécifiquement les cellules cancéreuses par rapport aux chimiothérapies actuelles, et cela sans une forte toxicité sur les cellules normales [8,20,22–24].

Dans ce cadre de la recherche pharmaceutique, bien qu'ils soient dotés de nombreux avantages biologiques, **l'application des PS en tant que principes actifs pharmaceutiques à part entière est freinée par des obstacles majeurs**. En raison de leur haut poids moléculaire (PM), de leur hétérogénéité et complexité structurale, les PS en général, et ceux d'origine algale en particulier, se caractérisent par une faible solubilité, une haute viscosité et une faible biodisponibilité, limitant ainsi leurs applications médicales [25]. S'ajoute à cela, la multiplicité de bioactivités souvent présente pour un même type de PS et qui peut être vue comme une « épée à double tranchant » [6,8,18–20]. D'un côté, cela ouvre la perspective de développement de nouvelles armes « poly-pharmacologiques », mais d'un autre, cela rend les comportements *in vivo* des PS aléatoires et difficiles à contrôler. En particulier, certaines de ces bioactivités sont associées à des propriétés défavorables pour les patients atteints de cancer. Par exemple, des effets pro-inflammatoires aigus ou anticoagulants (avec un risque d'hémorragies internes)

décrits pour certains PS, pourraient dégrader considérablement l'état physiologique déjà fragilisé d'un patient atteint par un cancer [26,27].

Pour lever ces contraintes associées aux PS natifs et afin de poursuivre la dynamique de **valorisation de ces substances algales bioactives jusqu'à des stades pré-cliniques ou cliniques**, l'utilisation d'oligosaccharides (OS), leurs dérivés de bas poids moléculaire (BPM), apparaît comme une des solutions les plus prometteuses à ce jour [28]. Ces OS présentent une meilleure solubilité et biodisponibilité, ainsi qu'une meilleure spécificité d'action thérapeutique comparée aux nombreuses activités biologiques parfois divergentes rencontrées chez leurs PS natifs d'origine [28,29].

Il n'y a que peu d'OS naturellement produits de façon endogène par les ressources naturelles qui ont été identifiés, à part les xylo-OS et les fructo-OS retrouvés dans les fruits et légumes [30]. Par conséquent, la voie principale pour la conception de ces OS reste d'une part, les approches dites « top-down » de dépolymérisation des PS natifs d'origine, par des méthodes physicochimiques et enzymatiques [30–32], et d'autre part, les approches dites « bottom-up ». Ces dernières consistent en la synthèse totale par des méthodes de chimie de synthèse (organique ou enzymatique) et biotechnologiques, qui connaissent un bon essor ces dernières années [31]. Néanmoins, celles-ci restent toutefois plus compliquées et moins utilisées en raison de la complexité structurale des sucres d'origine algale, qui requière des voies de synthèses multi-étapes et peu éco-compatibles. Plus généralement, ces méthodes « bottom-up » souffrent d'une faible reproductibilité et de faibles rendements [31,33].

Malgré de nombreux résultats prometteurs obtenus à l'échelle *in vitro* ou en pré-clinique sur des modèles animaux depuis plus d'une vingtaine d'années [28,34,35], à ce jour malheureusement, seuls les oligosaccharides de fucoïdanes (F-Os) ont atteint le stage clinique comme adjuvants aux traitement chimiothérapeutiques [36].

**De nombreuses actions de recherches restent en effet encore à réaliser afin de convertir les OS d'origine algale en formulations thérapeutiques de grade clinique. Celles-ci doivent notamment permettre de relever quatre défis principaux :**

***Défi 1- Standardisation de la matière première, choix et contrôle et de la méthode de dépolymérisation : la limitation de l'hétérogénéité***

Comme mentionné précédemment, l'obtention des OS se fait généralement à partir de PS d'algues prélevées directement du milieu naturel. Dans ces conditions, ces PS présentent une hétérogénéité dans leurs structures et une variabilité qui se répercutent sur les OS produits. Cette hétérogénéité des PS natifs est bien décrite dans la littérature comme associée aux conditions environnementales de développement de l'algue, de son espèce, de son cycle de reproduction, mais également des méthodes d'extraction et de la primo-purification des PS réalisées par les industriels [37].

Il est également important de noter que si beaucoup de PS sont disponibles commercialement et produits à des tonnages suffisants par l'industrie, cette production est adaptée selon des méthodes d'extraction et de primo-raffinage répondant aux critères de qualité demandés par le secteur agroalimentaire ou cosmétique, et qui sont bien moindres que ceux requis par la clinique [38,39]. Les produits commerciaux sont donc en fait souvent des mélanges de PS, eux-mêmes polydisperses, et parfois contenant de nombreux additifs. Si une bonne partie des études académiques s'affranchit de ce problème en partant de ses propres lots de PS purifiés obtenus en petite quantité en laboratoire à partir de l'algue pêchée, **de nombreux articles continuent d'utiliser des produits commerciaux et taisent cet aspect** [40–43]. Il est de toute façon impératif de montrer la faisabilité de production à grande échelle qui répond aux critères de bonnes pratiques de fabrication (BPF) et de bonnes pratiques de laboratoires (BPL) pour l'usage médical, comme l'ont initié de récentes études [44,45]. Dans ce sens, les approches de biosynthèses ou d'algoculture dans des conditions contrôlées sont encourageantes [46]. Les techniques d'extraction et de primo-raffinage industriels pour une amélioration éventuelle et pour un changement de pratiques, sont également une piste de recherche prometteuse pour garantir une production, avec un bon rendement maîtrisé, destinée à des applications cliniques [8].

Enfin, en aval, dans ce défi, il est important de maîtriser les éventuelles hétérogénéités supplémentaires retrouvées dans les OS du fait de la méthode de dépolymérisation utilisée.

Pour toutes les raisons explicitées ci-dessus, dans ces travaux de thèse, l'appellation « **formulations d'OS** » nous semble plus convenable à utiliser, pour bien éclairer la communauté sur le fait qu'il s'agisse d'une distribution plus ou moins homogène d'espèces.

## ***Défi 2- Criblage et identification de nouveaux OS thérapeutiques***

Il est en parallèle nécessaire de poursuivre à l'échelle laboratoire et préclinique les travaux d'identification de nouveaux candidats OS d'avenir thérapeutique d'origine algale. Ceux-ci reposent sur des stratégies classiques de criblage de bibliothèques de sucres issus de la dépolymérisation d'un PS natif extrait de l'algue ou commercial [47,48]. En fonction du type de dépolymérisation utilisé et des paramètres réactionnels appliqués (temps, concentration des réactifs, température, etc), les dérivés OS présentent différentes caractéristiques, spécifiées notamment par des paramètres moléculaires « basiques » tels que la taille ou le degré de sulfatation (DS), et par des structures moléculaires décrites (composition monosaccharidique, site de coupure des liaisons glycosidiques, affectation ou non des fonctions de substitutions, ouverture de cycle, etc) [48–51].

Des modifications chimiques contrôlées pré ou post-dépolymérisation peuvent également être effectuées pour modifier de manière ajustée les dérivés OS [52–55]. La sélection des candidats les plus prometteurs se fait ensuite en évaluant leurs activités sur les cibles d'intérêts, souvent au travers de tests biologiques *in vitro* [8,48,56]. Ces approches permettent de produire des études de structure-fonction utiles à l'identification des conditions optimales de dépolymérisation, favorisant l'obtention des architectures moléculaires les plus à même de réguler efficacement une cible thérapeutique [48,51]. Ce champ de recherche reste encore immense et demande à être poursuivi de manière plus standardisée. Notamment, il convient d'y intégrer certaines spécificités liées au type de biomolécules qui définissent les OS par rapport aux autres familles de molécules. En particulier, il faut discriminer les effets qui relèvent d'une interaction spécifique entre une séquence saccharidique précise identifiée au sein de l'OS avec une cible (exemple : la séquence pentasaccharidique de l'héparine qui interagit avec des acides aminées spécifiques de l'AT-III), des effets d'une interaction faible ou non spécifique issue d'encombrement stérique favorisé notamment par les groupements sulfates (exemple : effets

d'encombrement stérique des longues chaînes d'héparines sur le facteur Xa) [57]. Les deux effets restent d'intérêts et valorisables. Il est donc crucial de comparer les approches de criblage entre différentes familles de PS afin de bien déterminer le caractère « sucre-dépendant » et « séquence-spécifique » des effets observés.

### ***Défi 3- Compréhension des mécanismes d'action biologique des OS thérapeutiques identifiés***

Pour un contexte pathologique d'intérêt, il est important d'approfondir rapidement la compréhension des mécanismes d'action biologique des candidats OS identifiés et de pousser plus en avant les études d'évaluation des effets *in vitro*, en utilisant notamment des modèles cellulaires plus élaborés. Il est aussi important de mener des évaluations *in vivo* plus systématiques, associées à des études des propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques des candidats, effectuées plus en amont des recherches. En effet, bien que garantissant un meilleur contrôle que leurs PS parents, la multiplicité des modes d'actions biologiques reste une des caractéristiques de ces OS [28]. Il n'est pas rare qu'un candidat optimal pour une cible et, identifié par des approches de tests moléculaires, ne produise pas l'effet escompté lorsqu'il est ensuite testé *in cellulo* et *in vivo*, du fait d'autres interactions préférentielles en milieu complexe [8,58]. Encore plus courant, si l'effet est bien présent dans ces modèles avancés, l'examen des mécanismes biologiques sous-jacents peut révéler d'autres modes d'actions que celui médié par la cible préalablement visée dans les tests moléculaires (*in vitro*) [58]. De plus, intégrer des études qui examinent si les effets sont « sucres-dépendants » ou non apparaît très intéressant.

Dans ce contexte, mettre en évidence les caractéristiques « poly-pharmacologiques » d'un candidat OS, permettrait d'une part de mieux comprendre les effets thérapeutiques synergiques au sein d'un contexte pathologique donné, et d'une autre part, de mieux cibler l'environnement pathologique dans lequel il serait le plus efficace.

### ***Défi 4- Purification des formulations d'OS***

Il est de notoriété que les rigueurs législatives actuelles ne laisseraient plus passer en marché les OS thérapeutiques phares et les plus connus que sont les héparines anticoagulantes de BPM [59]. En ce sens, bien que répondre au ***défi 1- Standardisation*** amènera une

---

amélioration certaine en terme de réduction d'hétérogénéité des OS produits, il nous semble donc indispensable de poursuivre les recherches ayant trait aux techniques de post-purification des formulations d'OS pour finaliser une production qui répond aux BPF et BPL de la clinique en termes de qualité, de standardisation ou de reproductibilité. De plus, cela facilitera grandement les études structures-fonctions et de compréhension des mécanismes biologiques. En effet, les effets observés seront attribuables à une espèce homogène et non à une formulation d'espèces, certes proches mais avec des traits distincts, complexifiant l'interprétation des résultats d'efficacité. Dans ce contexte, les récentes avancées technologiques transposables à plus grande échelle dans le domaine de la chimie séparative (chromatographie liquide haute performance (HPLC) gel filtration, HPLC échangeuses d'ions, électrophorèse capillaire, etc) représentent une option importante pour relever ce dernier défi [28].

Bien que rares, les exemples d'essais cliniques effectués avec des OS dérivés de PS d'origine algale développés récemment, témoignent bien des possibilités de translation à la clinique pour ces recherches [36].

**C'est précisément dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse, dont les objectifs principaux étaient de concevoir des OS anticancéreux en abordant plusieurs aspects liés à ces quatre défis. L'intérêt principal était le développement d'inhibiteurs d'une cible thérapeutique d'avenir en oncologie, à savoir une protéine enzymatique clé dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) tumorale : l'héparanase (HPSE).**

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'équipe « Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé » (BCBS) de l'unité mixte La Rochelle université-CNRS 7266 Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs). Cette équipe a pour thématique principale la valorisation de substances naturelles d'origine marine pour un bénéfice santé. Un de ces axes de recherche, « substances naturelles bioactives pour le traitement des cancers », se focalise notamment **sur l'étude du potentiel d'OS d'origine algale à réguler une cible enzymatique particulièrement importante dans les mécanismes liés à la progression de la pathologie tumorale : HPSE**. Cette glycosidase est sécrétée au niveau de la MEC par la composante cellulaire du MET. Elle est, chez les mammifères, aujourd'hui la seule enzyme connue capable de cliver les chaînes d'héparanes sulfates (HS) des protéoglycanes (HSPG) constituant la MEC [60,61]. L'HPSE intervient dans des processus physiologiques (développement et remodelage

tissulaire) [62], mais en revanche, elle est particulièrement surexprimée dans de nombreux cancers (côlon, foie, pancréas, thyroïde, col de l'utérus, vessie, prostate, sein et estomac) [63,64]. Son action hydrolytique sur les HS induit d'une part un remodelage de la MEC qui va notamment faciliter l'invasion des cellules cancéreuses dans les tissus sains, et à terme l'apparition des métastases. D'autre part, la libération de médiateurs chimiques (par exemple : facteurs de croissances et cytokines), séquestrés dans les HS va déclencher de nombreux processus pro-tumoraux tels que l'angiogenèse, la croissance des cellules cancéreuses, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), ou encore l'inactivation de la réponse immunitaire [65]. À noter que de nombreux rôles non-enzymatiques favorisant la progression tumorale ont également été attribués à l'HPSE. Pour toutes ces raisons, **elle représente une cible thérapeutique d'intérêt majeur dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements en cancérologie.**

Parmi les familles d'inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'HPSE déjà décrites, celle des PS sulfatés est très attractive car ce sont des analogues structuraux plus ou moins proches des HS, le substrat naturel de l'HPSE. Néanmoins, comme mentionné précédemment, ces PS souffrent de nombreuses limitations : manque d'innocuité, une réponse pharmacodynamique difficile à contrôler due à la présence concomitante de bioactivités adverses, etc. C'est pourquoi la recherche s'est rapidement tournée vers la conception de leurs dérivés OS. C'est par exemple le cas de l'héparine, un PS sulfaté d'origine animale, considéré dans la littérature comme l'inhibiteur de référence de l'HPSE. L'héparine native possède des propriétés anticoagulantes, qui sont d'ailleurs à l'origine de sa commercialisation, mais qui peuvent poser d'importants problèmes d'hémorragie interne dans le cadre de son utilisation en oncologie.

Dans le cadre du développement de molécules ciblant une activité anti-HPSE, plusieurs groupes de recherches dont l'équipe BCBS ont donc proposé des dérivés de BPM non anticoagulants doublés ou non de modifications chimiques. Par exemple, un dérivé semi-synthétique de BPM de l'héparine, produit par le groupe pharmaceutique Shenzhen Hepalink basé en Chine, sous le nom de Roneparstat<sup>®</sup> (=SST0001), a fait l'objet de développements cliniques (phase 1, clinical trials : NCT01764880). Il a été proposé comme traitement contre la progression tumorale de myélomes multiples, à travers l'inhibition de l'HPSE [63]. Néanmoins, malgré son efficacité et sa non toxicité [63], pour l'instant, les investigations en phase II n'ont pas été poursuivies faute d'un réel bénéfice-sur-risque augmenté. De plus, en raison de son

origine animale (porcine, bovine, ovine), la production de l'héparine est très compliquée aussi bien d'un point de vue économique que d'un point de vue écologique, avec en plus de faibles rendements (une dose = un animal entier) associés à une purification fastidieuse. Le manque de pureté des lots a déjà été sujet à de grandes polémiques dans le passé. D'ailleurs, depuis les années 90, l'extraction de l'héparine bovine et ovine a été fortement limitée, en raison de développement de maladies à prions "Creutzfeldt-Jakob" [66]. Également, fin 2007 et début 2008, la contamination de plusieurs lots d'héparine par de la chondroïtine sur-sulfatée, a entraîné la mort de plusieurs patients [67,68].

Par conséquent, en alternative, les efforts de recherches se sont concentrés sur le développement d'OS inhibiteurs d'HPSE issus d'autres PS d'origine naturelle dont ceux d'origine algale. C'est précisément dans cette dynamique que l'équipe BCBS a alors réalisé un criblage préliminaire d'OS issus de plusieurs PS sulfatés naturels (dextran sulfate, chondroïtine sulfate, fucoïdane et carraghénanes (CARs) de types kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) et lambda ( $\lambda$ -) sur la base d'un test phénotypique *in vitro* d'inhibition de l'HPSE [69] (Thèse de Nicolas Poupard, 2014-2017). Celui-ci a permis de mettre en avant qu'un OS dérivé des CARs de type lambda ( $\lambda$ -CO) était particulièrement prometteur. Cette thèse est venue confirmer la littérature existante, qui montre que les  $\lambda$ -COs sont bien ceux qui présentent le plus d'intérêt quand on recherche des sucres algaux régulateurs de l'HPSE [63].

Les macromolécules de  $\lambda$ -CARs sont produites par les algues rouges. Sous leur forme native, ils présentent des propriétés physicochimiques (faible solubilité, haute viscosité et faible biodisponibilité) et des bioactivités défavorables (pro-inflammatoires, anti-coagulantes) qui justifient un criblage de leurs dérivés OS [70,71]. Dans ses travaux antérieurs, l'équipe a réalisé une étude structure/fonction pour identifier des candidats  $\lambda$ -COs obtenus par dépolymérisation chimique au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) présentant la balance la plus optimale entre leurs capacités d'inhibition de l'HPSE (test *in vitro*) et la perte de leurs activités anticoagulantes et pro-inflammatoires [48]. À travers ces travaux, plusieurs formulations de  $\lambda$ -COs se sont démarquées, et leur potentiel thérapeutique a été confirmé sur des modèles cellulaires (tests *in cellulo*) évaluant d'une part l'angiogenèse faite par des cellules microendothéliales (HsKMEC), et d'autre part la migration de cellules modèles (MDA-MB-231) du cancer du sein triple négatif (TNBC), deux processus décrits dans la littérature comme étant en partie médiés par l'activité enzymatique d'HPSE [48,58,72]. Fort de ses résultats, une autre thèse de l'équipe s'est ensuite

consacrée à mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents à ces effets exercés par ces  $\lambda$ -COs, notamment les effets régulateurs de la migration et de l'invasion mesurés à partir des cellules MDA-MB-231 [73] (Thèse Rémi Cousin, 2017-2021). De premiers faisceaux d'indices révélèrent que les effets observés *in cellulo* n'étaient que partiellement dus à l'inhibition de l'activité enzymatique HPSE, et que d'autres mécanismes étaient à l'œuvre, notamment au travers de l'interaction avec des facteurs de croissance, de la régulation de l'expression génique et protéique de l'HPSE, ou de la modification d'activités de certaines métalloprotéases (formant l'axe MMP-14/MMP-2). Ces derniers résultats viennent parfaitement illustrer les points clés énoncés dans le *défi 3- Compréhension* des mécanismes exposés ci-dessus.

**À ce stade de l'avancée des recherches de l'équipe, mes travaux de doctorat visaient à poursuivre la maturation des formulations de ces  $\lambda$ -COs en vue d'applications cliniques en oncologie et, plus généralement, à soutenir le développement d'OS thérapeutiques inhibiteurs de l'HPSE. Tout du long de ces travaux, les quatre défis liés au développement d'OS thérapeutiques ont guidé mes réflexions dans la planification de mes expériences de laboratoire.**

Ainsi, dans ces travaux doctoraux, financés par le comité départemental de Charente-Maritime de la Ligue Contre le Cancer, deux volets de recherche ont été définis puis déclinés sous la forme de deux chapitres dans la partie résultats et discussions de ce manuscrit :

## Chapitre 1

Le chapitre 1 a principalement traité les difficultés liées à la matière première commerciale polysaccharidique de  $\lambda$ -CARs, telles que **l'hétérogénéité structurale** et le **mélange d'espèces** dans les produits commercialisés, provenant à la fois de la variabilité environnementale et des pratiques d'extraction industrielles (*défi 1- Standardisation*). Dans ce cadre, l'objectif principal du chapitre 1 était d'étudier **comment cette matière première pouvait impacter le développement de  $\lambda$ -COs thérapeutiques anti-HPSE en comparant des formulations issues de plusieurs produits commerciaux de  $\lambda$ -CAR**. À cette occasion, les travaux ont également permis d'approfondir des études structures-fonctions des capacités d'autres types de CARs pour l'inhibition de l'HPSE (*défi 2- Criblage*), mais aussi d'examiner si les résultats du crible *in vitro* sur la cible HPSE suffisaient pour valider l'efficacité biologique

des candidats sur des modèles cellulaires plus avancés, et de vérifier si les effets sont « contexte pathologique dépendants » en les comparant à des travaux précédents réalisés sur un autre modèle cellulaire (*défi 3- Compréhension*).

## Chapitre 2

Ce deuxième chapitre se place au cœur du *défi 2- Criblage* pour le développement d'OS transposables à la clinique : poursuivre les approches de criblage d'OS algaux contre notre cible d'intérêt, l'HPSE. L'objectif principal était **d'explorer les capacités anti-HPSE d'OS dérivés d'un PS marin d'une autre origine algale, le fucoïdane commercial issu de l'algue brune *Fucus vesiculosus* (F-Os)**. À cette occasion, nous avons également étudié l'impact de l'ajustement des paramètres réactionnels d'une méthode de dépolymérisation radicalaire lors d'études structures-fonctions plus poussées (*défis 1- Standardisation et 2- Criblage*). La comparaison des résultats obtenus avec ceux portant sur les  $\lambda$ -COs a également permis de mieux discuter les effets d'inhibitions observés (spécifiques et/ou d'encombrement stérique faible, « sucre-dépendant », etc). Enfin, dans ce deuxième chapitre, plusieurs travaux autour du *défi 3- Compréhension* ont été conduits. D'une part, des tests évaluant la capacité des F-Os à contrer la viabilité et la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ont été effectués, permettant d'examiner à nouveau la pertinence du crible *in vitro* de l'activité anti-HPSE. D'autre part, afin de positionner au mieux ces F-Os et d'aborder des aspects liés à la « poly-pharmacologie » des formulations dans un contexte pathologique différent, nous avons également évalué d'autres types de bioactivités (cytotoxicité et modulation du point de contrôle immunitaire du programmed death ligand-1 (PD-L1)) dans un modèle différent de cancer, le lymphome B, un cancer liquide.

Il faut noter que le dernier *défi 4- Purification* sur la post-purification des formulations d'OS pour permettre d'atteindre les grades de qualité clinique sera discuté de manière plus générale et au regard des résultats exposés dans ce manuscrit dans la partie conclusions et perspectives.

C'est dans ce contexte général et selon ces objectifs que ce travail de thèse s'inscrit. Ils se déclineront dans ce manuscrit sous la forme de trois grandes parties :

- **Une partie 1** qui présentera une **synthèse bibliographique** centrée sur les deux grands types de PS d'origine algale du travail doctoral à savoir les CARs et les fucoïdanes. Cette synthèse détaillera leurs origines, structures chimiques, nomenclatures et classifications, méthodes d'extractions, et les facteurs impactant leurs diversités structurales. Puis les méthodes de préparation des OS dérivant de leurs polymères, ainsi que leurs méthodes de purification seront présentées. Cela sera complété avec une synthèse des études décrivant les activités anti-tumorales des OS algaux dérivés de  $\lambda$ -CARs et des fucoïdanes (hors cible HPSE). L'HPSE étant l'enzyme cible de notre projet, des rappels sur son mode d'action, ses fonctions biologiques dans le cancer, et sa possible inhibition par les OS d'origine algale, dont les  $\lambda$ -COs et F-Os, seront détaillés. Enfin, au regard de la bibliographie, les problématiques et objectifs abordés pendant la thèse, ainsi que les approches utilisées pour y répondre, seront présentés.
- **Une partie 2** portera sur les **matériels et méthodes utilisés et/ou développés**, qui ont permis la préparation, la caractérisation et l'étude des bioactivités des PS/OS d'intérêt.
- **Une partie 3** présentera les **résultats obtenus**. Le premier chapitre sera exposé sous la forme d'un article publié, accompagné de discussions des faits marquants, traitant principalement l'impact de la composition de la matière première sur la conception de formulations de  $\lambda$ -COs anti-HPSE et leurs activités régulatrices de la migration des cellules d'hépatocarcinome humain Huh7. Le second chapitre sera décomposé en deux sections : une première traitera principalement du criblage des activités anti-HPSE des formulations de F-Os et de leurs activités régulatrices de la migration de cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231. La seconde illustrera les résultats publiés issus d'une collaboration académique, accompagnée d'un résumé des faits marquants sur l'effet anti-cancéreux de formulations F-Os de très bas poids moléculaire (tBPM-F) dans le cadre de lymphomes B.

Enfin, une **conclusion générale** viendra reprendre l'ensemble des résultats et ouvrira vers **les principales perspectives** envisagées pour la poursuite de ce projet de recherche.

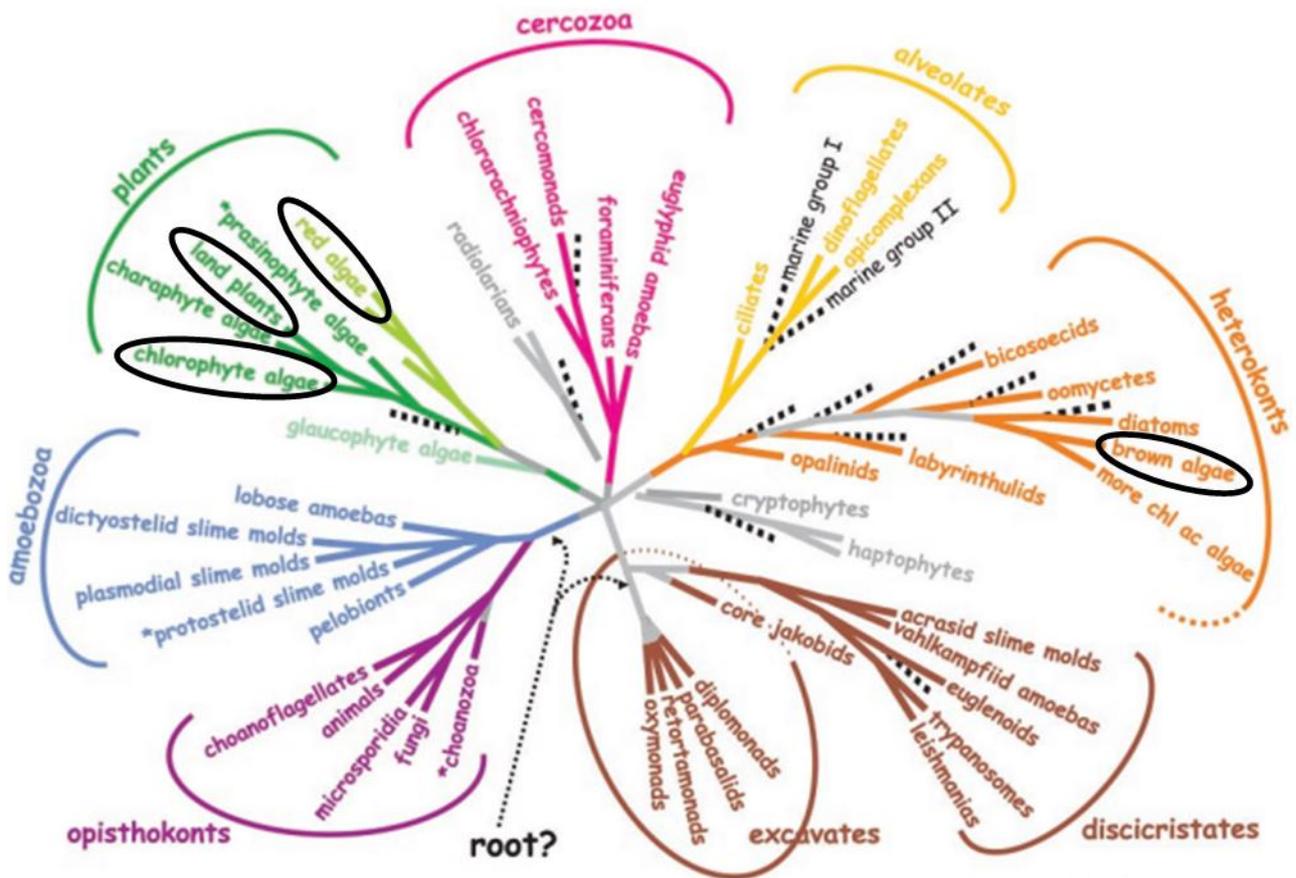


## **Partie 1 : Étude bibliographique**



## 1. Généralités sur les polysaccharides d'origine algale

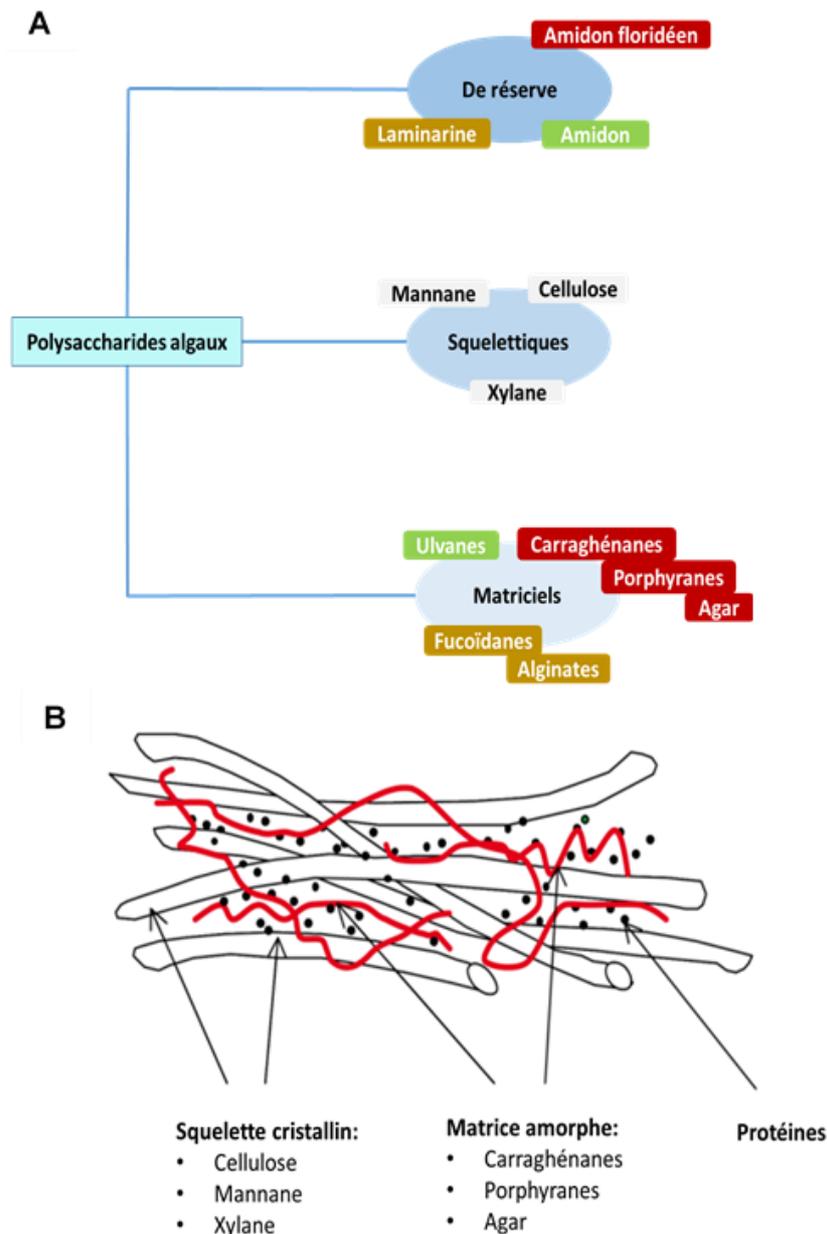
Les macroalgues marines sont des organismes eucaryotes photosynthétiques appartenant à des lignées phylogénétiques différentes. Tout comme les plantes supérieures (Streptophyta), les algues rouges (Rhodophyta) et les algues vertes (Chlorophyta), font partie de la lignée des plantes, contrairement aux algues brunes (Phaeophyta), qui elles, appartiennent à la lignée des hétérokonts (**Figure 1**).



**Figure 1.** Position des macro-algues et des plantes supérieures dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes [74].

Ces macroalgues marines partagent la particularité avec les plantes supérieures, de contenir une paroi autour de leurs membranes plasmiques [75]. En revanche, les algues marines se distinguent par leur abondance en PS sulfatés, dont la biosynthèse est fortement liée à une adaptation à un milieu riche en sulfates [75]. Par exemple, dans le milieu marin, la concentration en sulfates est assez élevée, à savoir, de 28 mM, tant dis qu'elle varie de 0,09 à 1,40 mM dans

l'eau douce et dans l'eau interstitielle des sols [75]. Il faut noter que ces PS sulfatés ne sont pas complètement absents chez les plantes terrestres. En effet, il est possible de les retrouver dans les graines de *Pimpinella anisum* (connue sous le nom d'anis), ou encore dans les tiges de laitue. Néanmoins, le DS est compris entre 0,83–13,29% du poids sec, en étant beaucoup plus faible par rapport à celui des algues marines, qui peut aller jusqu'à 42% [76].



**Figure 2.** Classification des polysaccharides et leur organisation au sein de l'algue. **(A)** Principaux polysaccharides rencontrés dans la paroi des macro-algues [6]. **(B)** Représentation schématique de la paroi des algues rouges [77].

---

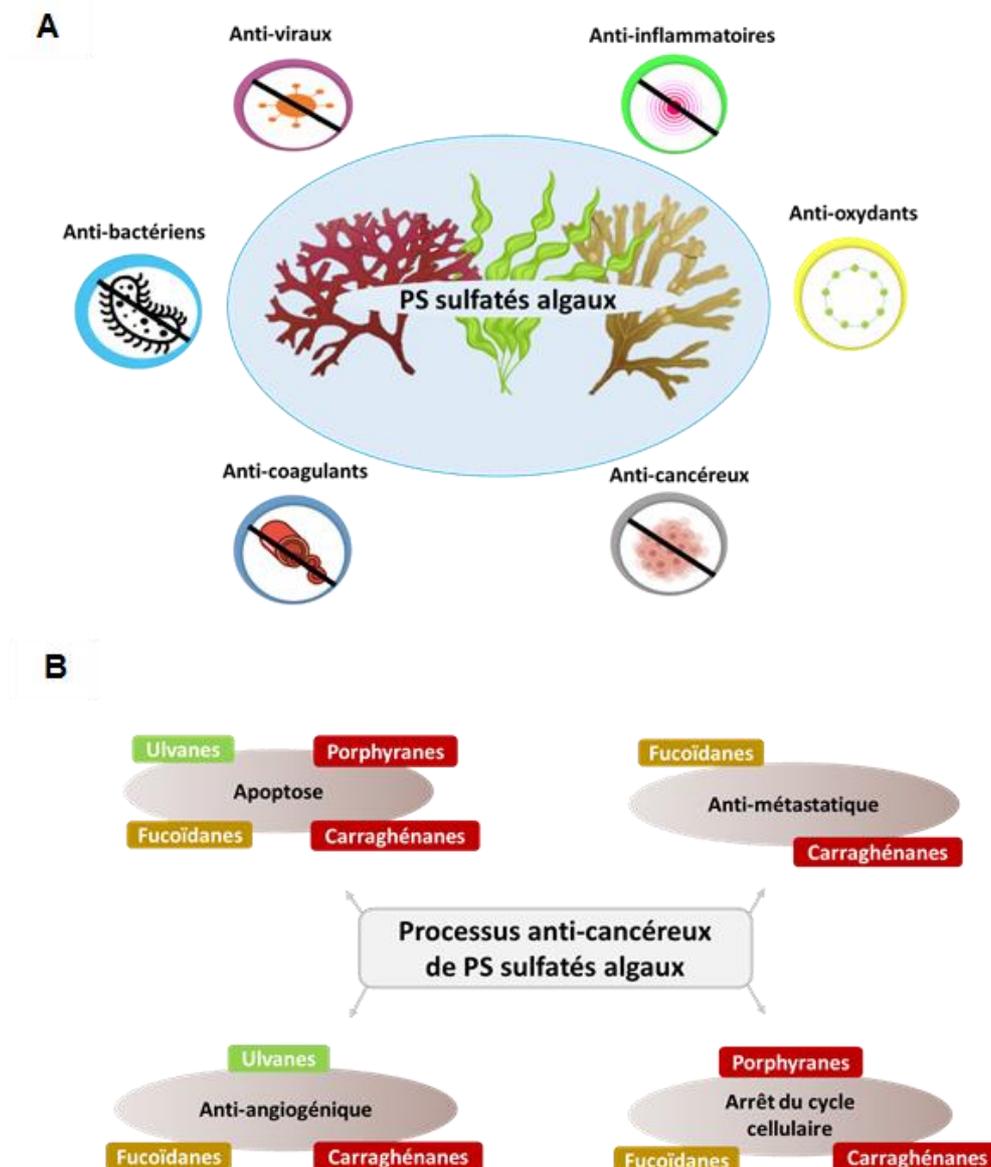
Comme toutes les cellules végétales, les cellules algales contiennent une paroi dite biphasique caractérisée par sa semi-rigidité [6,11]. Elle est constituée d'une part d'une phase cristalline composée principalement de cellulose formant le squelette, qui peut être également constituée de xylane et de mannane chez les algues rouges et vertes (**Figure 2 A-B**) [11]. D'une autre part, d'une phase dite amorphe composée de PS sulfatés ou non, formant ainsi une matrice (**Figure 2 B**) [11]. Par exemple les CARs, Agars et Porphyrans, sont des PS retrouvés dans la phase amorphe de la paroi des algues rouges (**Figure 2 A-B**) [11]. En revanche, chez les algues brunes, elle est composée d'alginate et de fucoïdanes (**Figure 2 A**) [11]. Cette phase amorphe chez les algues vertes quant à elles, est constituée d'ulvanes (**Figure 2 A**) [11].

L'ensemble de ces biomacromolécules procure des propriétés importantes à la paroi cellulaire des algues, que ce soit d'un point de vue structurel ou fonctionnel. En effet, elles permettent d'assurer une résistance mécanique à travers sa rigidité et sa flexibilité, des échanges avec l'environnement marin, etc [6,11]. L'hydratation est assurée grâce à la présence des PS sulfatés à travers leur caractère polyanionique [78]. Également, au sein de l'algue, les PS sont impliqués dans de nombreux processus biologiques vitaux tels que l'adhésion cellulaire, la reproduction et la morphogénèse [11,79].

Par ailleurs, les algues contiennent également des PS de réserve (amidon, laminarine, etc) stockés au niveau de leurs plastes, permettant de maintenir le métabolisme de base (**Figure 2 A**) [6,11].

Dans notre étude, les PS sulfatés d'origine algale sont notre centre d'intérêt. Ils ont attiré l'attention à plusieurs échelles. Ils ont notamment suscité beaucoup d'intérêt en tant qu'additifs fonctionnels dans le domaine pharmaceutique et biomédical [9,15,16], mais aussi dans les industries alimentaire [12] et cosmétique [13,14]. Au cours de la dernière décennie, les études sur le potentiel pharmacologique prometteur des PS sulfatés d'origine algale se sont multipliées. Cela a donné lieu à différentes applications pharmacologiques qui ont été testées *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* dans des modèles animaux avec des résultats prometteurs [23,80]. Ces PS sont dotés de nombreuses activités biologiques incluant des activités anti-oxydantes, anti-virales, anti-bactériennes, anti-cancéreuses, etc (**Figure 3 A**) [6,8,18–21]. Leur potentiel anti-cancéreux a fait l'objet de nombreuses études à travers leurs implications dans des processus anti-tumoraux, incluant des effets anti-métastatiques, anti-angiogéniques ou encore l'induction de

l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (**Figure 3 B**) [23]. En cancérologie, comme indiqué dans l'**Introduction générale**, les PS sulfatés se démarquent notamment grâce à leur double pouvoir: anti-prolifératif en partageant des mécanismes communs aux chimiothérapies (arrêt du cycle cellulaire et apoptose) mais en étant plus spécifiques, et de manière plus intéressante, une capacité à réguler des composés clés du MET impliqués dans de nombreux processus pro-tumoraux (métastases, migration, angiogenèse, invasion, immunomodulation, etc) [8,20,22–24]. Ainsi, il est donc possible de dire que les PS sulfatés d'origine algale, sont des macromolécules « poly-pharmacologiques ».



**Figure 3.** Propriétés biologiques des PS sulfatés d'origine algale (**A**) Bioactivités globales. (**B**) Processus anti-cancéreux des PS sulfatés d'origine algale [23].

## 2. Les polysaccharides natifs d'origine algale de l'étude

Pour ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés particulièrement à deux polysaccharides d'origine algale, à savoir, le  $\lambda$ -carraghénane ( $\lambda$ -CAR) et le fucoïdane.

### 2.1. Les carraghénanes (CARs)

#### 2.1.1. Origine

Les CARs sont des PS linéaires produits par de nombreuses espèces d'algues rouges (division des Rhodophytes) appartenant aux genres *Eucheuma*, *Gigartina*, *Hypnea*, *kappaphycus*, *Chondrus* et *Mastocarpus*. Ils ont été extraits pour la première fois à partir de l'espèce *Chondrus Crispus* en 1810 en Irlande, et servaient comme traitements à des maux respiratoires [9]. Le lambda ( $\lambda$ ), kappa ( $\kappa$ ) et iota ( $\iota$ ) CARs sont les trois types de CARs les plus commercialisés, obtenus principalement à partir des espèces *Chondrus spp.*, *Kappaphycus alvarezii* (*Eucheuma cotonii*) et *Eucheuma denticulatum* (*Eucheuma spinosum*), respectivement [81]. La production des différents CARs par quelques espèces d'algues rouges avec leurs localisations est résumée dans le **Tableau 1**.

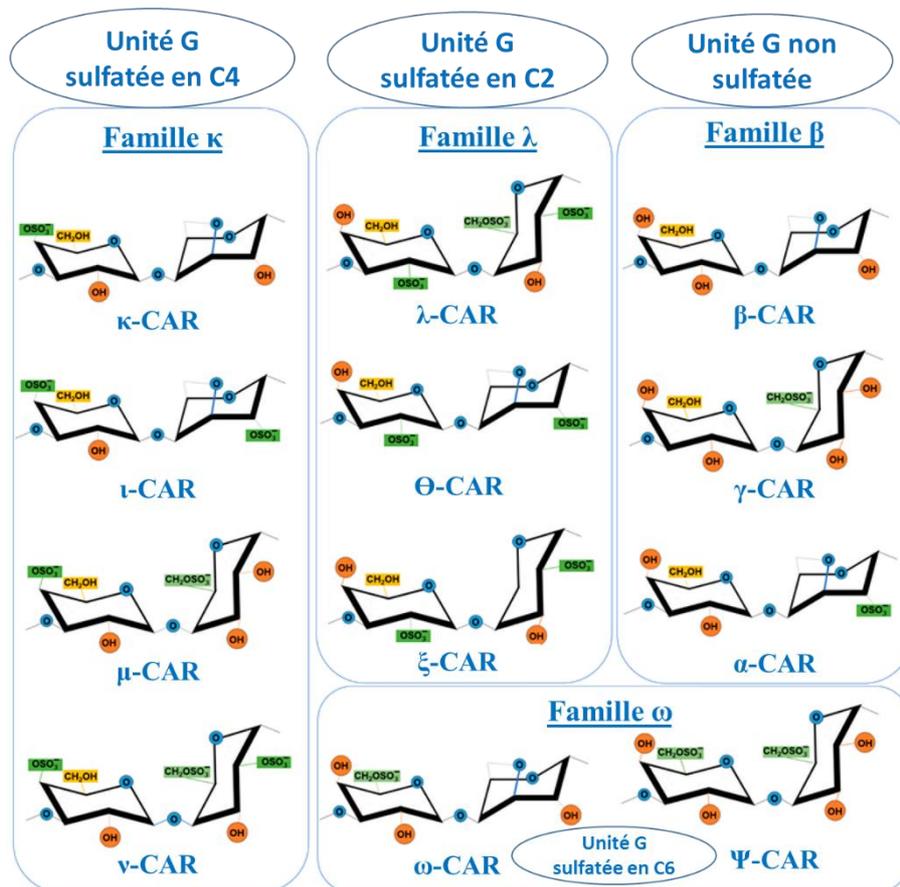
**Tableau 1.** Liste et localisation de quelques espèces d'algues rouges productrices des principaux CARs [81–83].

Espèce d'algue	Type de CAR	Localisation
<i>Chondrus crispus</i>	$\lambda$ , $\kappa/\iota$	France, Canada, Irlande
<i>Chondrus ocellatus</i>	$\lambda$ , $\kappa/\iota$	Corée
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	$\kappa$	Indonésie, Philippines
<i>Eucheuma denticulatum</i>	$\iota$	Indonésie, Philippines
<i>Hypnea musciformis</i>	$\kappa/\iota$	Brésil, Caroline du nord
<i>Gigartina radula</i>	$\lambda$ , $\kappa/\iota$	Chili
<i>Gigartina pistillata</i>	$\lambda$ , $\kappa/\iota$	Espagne, Maroc, France
<i>Gigartina skottsbergii</i>	$\lambda$ , $\kappa/\iota$	Chili

Il est important de noter que les types de CARs présentés dans le **Tableau 1** sont **les espèces majoritairement produites**. En effet, d'autres types peuvent être présents dans chaque algue, à proportions variables, dépendamment de plusieurs facteurs, notamment de **l'espèce d'algue** et de **son cycle de reproduction**.

### 2.1.2. Structures chimiques

Les CARs sont une famille de PS de haut PM moyen compris entre 100 et 1000 kDa [84]. Le DS moyen des CARs commerciaux est de 38% (w/w), 22%(w/w) et 32%(w/w), respectivement pour le  $\lambda$ -,  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs [84], en tenant compte de l'impact que peuvent avoir les variations incluant l'espèce d'algue, le cycle de reproduction, la méthode d'extraction et l'environnement cultural, qui seront discutées dans le titre **2.4** de cette **étude bibliographique**.



**Figure 4.** Structures chimiques des familles de CARs classées en fonction de la position des groupements sulfates sur l'unité G du disaccharide de galactopyranose [85].

La structure des CARs est constituée de polygalactanes sulfatés linéaires et composée alternativement d'unités répétitives d'un disaccharide constitué de (1→3)  $\alpha$ -D-galactopyranose et (1→4)  $\beta$ -D-galactopyranose appelé « carrabiose » [84,86]. Il existe plusieurs types de CARs avec des structures variables, qu'il est possible de distinguer rapidement par le degré et la position des groupements sulfates, ainsi que la présence ou non d'un pont 3,6 anhydro sur l'unité liée en  $\alpha$ -1,3 (**Figure 4**). Il faut noter que la présence de ce pont, permet aux types  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs d'acquérir des propriétés gélifiantes, contrairement au type  $\lambda$ - qui lui en est dépourvu, et est connu pour son caractère épaississant [9].

Le « disaccharide de répétition » est une représentation simplifiée et idéalisée des CARs [84]. En effet, en plus des groupements sulfates, les unités disaccharidiques peuvent être substituées par des groupements méthyles ou pyruvates, comme d'autres résidus carbohydrates peuvent être présents, tels que, le xylose, le glucose et les acides uroniques [84,87]. La conformation des CARs est différente d'un type à un autre. Celle en chaise  ${}^4C_1$  concerne les unités  $\beta$ -D-galactopyranoses et  $\alpha$ -D-galactopyranoses. En revanche, dans le cas des unités 3,6-anhydro-D-galactopyranose, la conformation chaise  ${}^1C_4$  est adaptée [9].

### 2.1.3. Nomenclatures des CARs

Après la découverte des différentes structures des CARs, une nomenclature basée sur les lettres grecques a été définie, en attribuant une nouvelle lettre grecque à chaque nouvelle unité disaccharidique [88]. Bien que cette nomenclature reste encore très utilisée aujourd'hui, ces attributions n'ont pas été faites d'une manière logique et systématique, rendant ainsi leurs mémorisations difficiles en raison du grand nombre de structures existantes (au moins 15 structures différentes) [88]. Par conséquent, un autre type de nomenclature plus détaillé a été par la suite intégré par Knutsen *et al.* 1994 [88], et validé par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Il permet de décrire les chaînes complexes de CARs pouvant contenir plusieurs motifs disaccharidiques différents. Les unités galactoses sont notées **G** en étant liées en  $\beta$ -1,4, et **D** si la liaison est en  $\alpha$ -1,3. Cette dernière peut être sous la forme de 3,6-anhydro-galactopyranoses, et notée **DA**. Lorsqu'une unité est substituée par un groupement sulfate, celui-ci est noté **S**. Le **M** est attribué pour les groupements méthyles, précédés du carbone porteur. Concernant les groupements pyruvates, ils sont notés **P**. Si la chaîne est substituée par des unités de xylose, la lettre **X** est attribuée. Des virgules sont utilisées pour séparer les différentes substitutions. Par exemple, les principaux CARs commerciaux  $\lambda$ -,  $\kappa$ -,  $\iota$ -

CARs sont décrits par les codes G2S-D2S,6S; G4S-DA et G4S-DA2S respectivement (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Quelques exemples de la nomenclature des CARs basée sur les codes à lettres [88].

CARs code à lettres	CARs lettres grecques
G2S-D2S, 6S	$\lambda$
G4S-DA	$\kappa$
G4S-DA2S	$\iota$
G4S-D2S,6S	$\nu$
G4S-D6S	$\mu$

#### 2.1.4. Classifications

La première classification des CARs était basée sur leur solubilité dans le chlorure de potassium (KCl) [89]. L'étude portant sur l'espèce d'algue rouge *Chondrus crispus* a montré la présence de deux formulations en présence de KCl. La formulation soluble (non gélifiante) a été nommée  $\lambda$ -CAR, tandis que la dénomination  $\kappa$ -CAR a été assignée à la formulation insoluble (gélifiante).

L'avancée de l'analyse structurale des CARs a permis d'introduire en 1979 un autre type de classification, basé sur la position des groupements sulfates au niveau de l'unité **G** (**Figure 4**). Au début, les familles  $\kappa$  et  $\lambda$  ont d'abord été distinguées [90], suivies des familles beta ( $\beta$ ) [91] et oméga ( $\omega$ ) [92].

Il faut également noter qu'en plus des types majoritaires de CARs ( $\lambda$ -,  $\kappa$ -,  $\iota$ -), deux autres types sont également très connus, à savoir, le mu ( $\mu$ ) et le nu ( $\nu$ ), décrits comme précurseurs biologiques des types  $\kappa$ - et  $\iota$ -, respectivement (**Figure 4, Tableau 2**) [84]. En effet, lors de la biosynthèse au sein de l'algue, la réaction enzymatique des sulfohydrolases convertit le  $\mu$ - et le  $\nu$ - en  $\kappa$ - et  $\iota$ -, respectivement [93–95]. Cette conversion se fait par la formation du motif 3,6-anhydro-D-galactose [93,95]. En revanche, à l'échelle industrielle, un traitement alcalin est réalisé afin de maximiser cette conversion pour garantir les propriétés physicochimiques souhaitées (augmenter les propriétés gélifiantes) [84,96,97]. Par conséquent, les  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs commerciaux sont en réalité des copolymères de  $\kappa/\mu$  et de  $\iota/\nu$  CARs, respectivement [97]. En ce qui concerne le  $\lambda$ -CAR, lui-même est considéré comme précurseur [97]. Durant le processus

---

industriel, il n'est que partiellement convertit (environ 10%) en thêta ( $\theta$ ) CAR, tout en gardant son appellation d'origine de «  $\lambda$ -CAR » [97].

À l'échelle industrielle, les CARs sont classifiés selon la méthode d'extraction utilisée, en Carraghénanes Raffinés (CR, E407) et en Carraghénanes Semi Raffinés (CSR, E407-a), qui sont distingués par la concentration de la matière insoluble en acide (MIA), essentiellement constituée de cellulose [9,97]. Le CR E407 contient très peu de MIA (<2,0 %), contrairement au CSR, qui lui est beaucoup moins pur, et peut contenir entre 8-15% de MIA [97]. Dans la législation européenne, les numéros d'additifs alimentaires E-407 et E407-a ont été attribués au CR et au CSR, respectivement [9]. Afin de comprendre l'origine de cette différence, il est nécessaire de revenir aux processus détaillés d'extraction appliqués pour l'obtention de l'un et de l'autre (**voir 2.3 de cette étude bibliographique**). Il faut également noter que les CARs commerciaux sont généralement vendus en tant que sels de sodium, de potassium, de calcium, ou un mélange de ceux-ci [98].

## 2.2. Les fucoïdanes

### 2.2.1. Origine

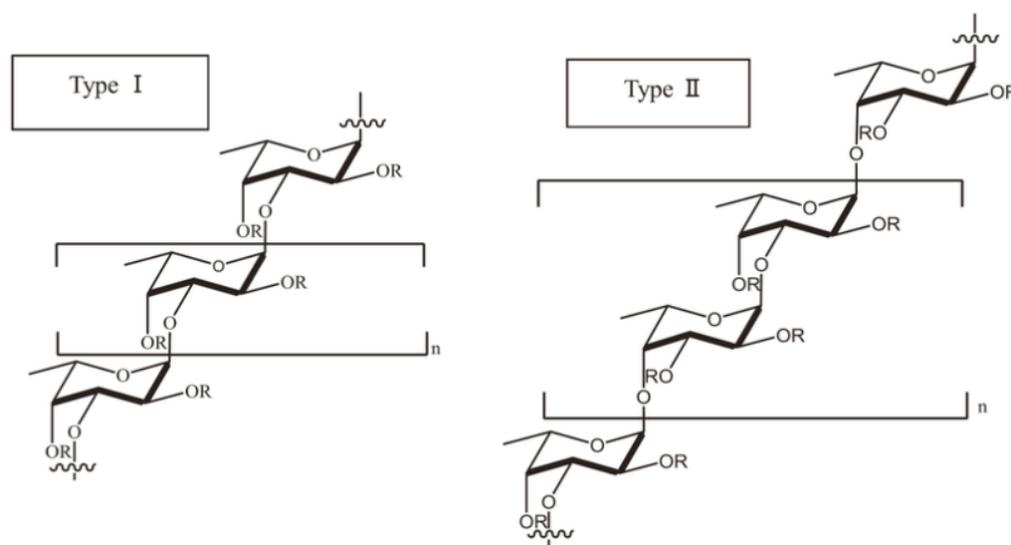
Le chimiste Suédois, Harald Kylin, a été le premier en 1913 à isoler un polymère riche en fucose sous la forme d'un film visqueux nommé à l'époque « fucoïdine ». Après environ 45 ans, le terme fucoïdane a été introduit afin de respecter les règles de l'IUPAC [99]. Les algues brunes (Phaeophyceae) les plus étudiées par le professeur Kylin étaient celles des ordres des Fucales et Laminariales : *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata* et *Laminaria saccharina* [99]. D'autres chimistes ont également confirmé la structure des fucoïdanes en tant que polymères sulfatés riches en fucose [100–102]. Au fil des années, les recherches ont permis de déterminer les premières méthodes d'extraction des fucoïdanes, et une meilleure compréhension de leurs propriétés physicochimiques [100–102]. Leur consommation seule ou avec d'autres plantes étant très répandue, la commercialisation d'un fucoïdane brute extrait de *Fucus vesiculosus* a ainsi été réalisée en 1970 par la société Sigma Inc (États-Unis). Après cette initiative, des chercheurs Japonais ont pu identifier pour la première fois les effets anticancéreux des fucoïdanes [103]. Dans les dix ans suivants, des travaux se sont poursuivis sur les effets exercés par les fucoïdanes dans les réponses immunes et inflammatoires et dans le retard de la progression tumorale [104].

En 2003, la compagnie australienne Marinova a développé avec l'algue *Undaria pinnatifida* les premières techniques d'extraction aqueuse avec un fucoïdane préservé dans sa structure chimique et sans contamination par des solvants résiduels. Il est important de mentionner que les fucoïdanes extraits de l'algue brune *Fucus vesiculosus* ont le statut « Généralement Reconnu comme Sûr » (GRAS) et aussi l'approbation de l'Union Européenne pour les nouveaux aliments (European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2014 - EMA/HMPC/313675/2012), comme de celle de l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (U.S. Food and Drug Administration, GRAS Notice No. GRN 000661) [105].

Par ailleurs, en plus des algues brunes, certains invertébrés marins, comme l'oursin et le concombre de mer, produisent également des fucoïdanes [106].

### 2.2.2. Structures chimiques

Les fucoïdanes sont des PS avec un PM moyen compris entre 10 et 10 000 kDa selon la source, avec un PM moyen de 20 kDa [107]. Le DS moyen quant à lui, peut varier entre 15 et 30 % selon l'espèce d'algue brune [52].



**Figure 5.** Structure du fucoïdane de type I et de type II [52].

La référence de classification des fucoïdanes est le plus souvent liée à son squelette. En revanche, comme la structure de ces PS est généralement très complexe en ayant beaucoup de ramifications, la description du squelette ne couvre pas la structure globale de la molécule [108]. Il est toutefois possible de distinguer 2 types principaux de fucoïdanes. Le squelette du type I est constitué de résidus (1→3)- $\alpha$ -L-fucopyranoses (**Figure 5**) [52,108]. Celui du type II est plutôt composé d'une combinaison alternative de résidus d' $\alpha$ -L-fucopyranoses liés par (1→3) et (1→4) (**Figure 5**) [52,108]. La sulfatation dans le type I se trouve au niveau des positions C2 et C4, contrairement au type II, où les sulfates sont plutôt positionnés en C2, C3 et C4 [52]. De nombreuses algues brunes appartenant aux ordres Chordariales et Laminariales produisent le fucoïdane de type I, tandis que celles de l'ordre des Fucales contiennent plutôt le type II [52]. Sur ces structures, en plus des groupements sulfates, le squelette des fucoïdanes peut présenter des points de ramifications par des résidus incluant de l'acide uronique, du rhamnose, glucose, galactose, xylose, mannose, arabinose, ribose et de l'acide glucuronique (les plus retrouvés) [108].

En fonction de l'espèce, la structure des fucoïdanes peut être différente. Par exemple, dans notre étude, nous nous sommes intéressés au fucoïdane commercial extrait de l'espèce *Fucus vesiculosus* faisant partie du type II [108]. Il s'agit de la structure la plus étudiée en raison de sa simplicité, composée principalement de fucose (44%), de sulfates (26%), et de cendre (31%) [108,109]. La sulfatation chez celui-ci se trouve généralement à la position O-2 et parfois à la position O-3, les deux possibilités pouvant avoir lieu en même temps [108].

Les facteurs incluant la source des fucoïdanes, leur PM, DS, la présence de co-extraits, la composition en sucre, et le degré de branchement, etc, influencent les bioactivités exercées par ces macromolécules [52]. L'ensemble de ces paramètres est en lien direct avec plusieurs facteurs qui seront discutés dans la partie « **2.4 de cette étude bibliographique** ».

### 2.2.3. Nomenclatures et classifications

Dans une revue réalisée par Deniaud-Bouët *et al.* 2017, une nuance importante a été soulignée concernant la structure des fucoïdanes et leur appellation [99]. En effet, le terme fucoïdanes a été décrit comme un groupe de polymères appartenant aux PS riches en fucoses, avec une complexité du squelette ramifié composé d'une diversité de résidus (monosaccharides neutres/acides uroniques/Acétyle). Par exemple, il est possible de citer les

xylofucoglucurmannanes, les fucoglucuronanes, ou encore les fucogalactanes. En revanche, le terme fucanes sulfatés décrit plutôt des homopolymères composés principalement de L-fucoses, appelés homofucanes. Néanmoins, dans la littérature, cela a souvent été sujet de confusion, avec une utilisation abusive du terme fucoïdane, quel que soit la structure du PS en question.

Dans la littérature, en plus de leurs architectures structurales/moléculaires/saccharidiques, les fucoïdanes sont souvent classés en 3 groupes: des fucoïdanes de bas poids moléculaire (Low Molecular Weight Fucoïdan - LMWF) (<10 kDa), de poids moléculaire moyen (Medium Molecular Weight Fucoïdan - MMWF) (10-10 000 kDa) et de haut poids moléculaire (High Molecular Weight Fucoïdan - HMWF) (> 10 000 kDa) [108]. Ces trois groupes ont fait l'objet de beaucoup d'études de relation taille/fonction dans le cancer, elles seront discutées dans les parties dédiées aux bioactivités anti-tumorales des fucoïdanes et F-Os (voir **3.2** et **4.4.3.4** de cette **étude bibliographique**).

### 2.3. Les méthodes d'extraction et de purification des CARs et des fucoïdanes

L'extraction des PS d'origine algale de manière générale peut se faire d'une part selon des méthodes dites conventionnelles (classiques) faisant recours à des solvants d'extractions acides, basiques ou simplement aqueux (**Figure 6**). D'une autre part, des méthodes dites innovantes ont été développées utilisant des enzymes, assistées par micro-ondes ou par ultrasons, dans le but d'améliorer le rendement et la qualité du produit, réduire le temps et le coût d'extraction, etc (**Figure 6**).

Les méthodes d'extraction conventionnelles des CARs en fonction de leur type et des fucoïdanes seront présentées en détails, et les innovantes quant à elles seront évoquées brièvement.

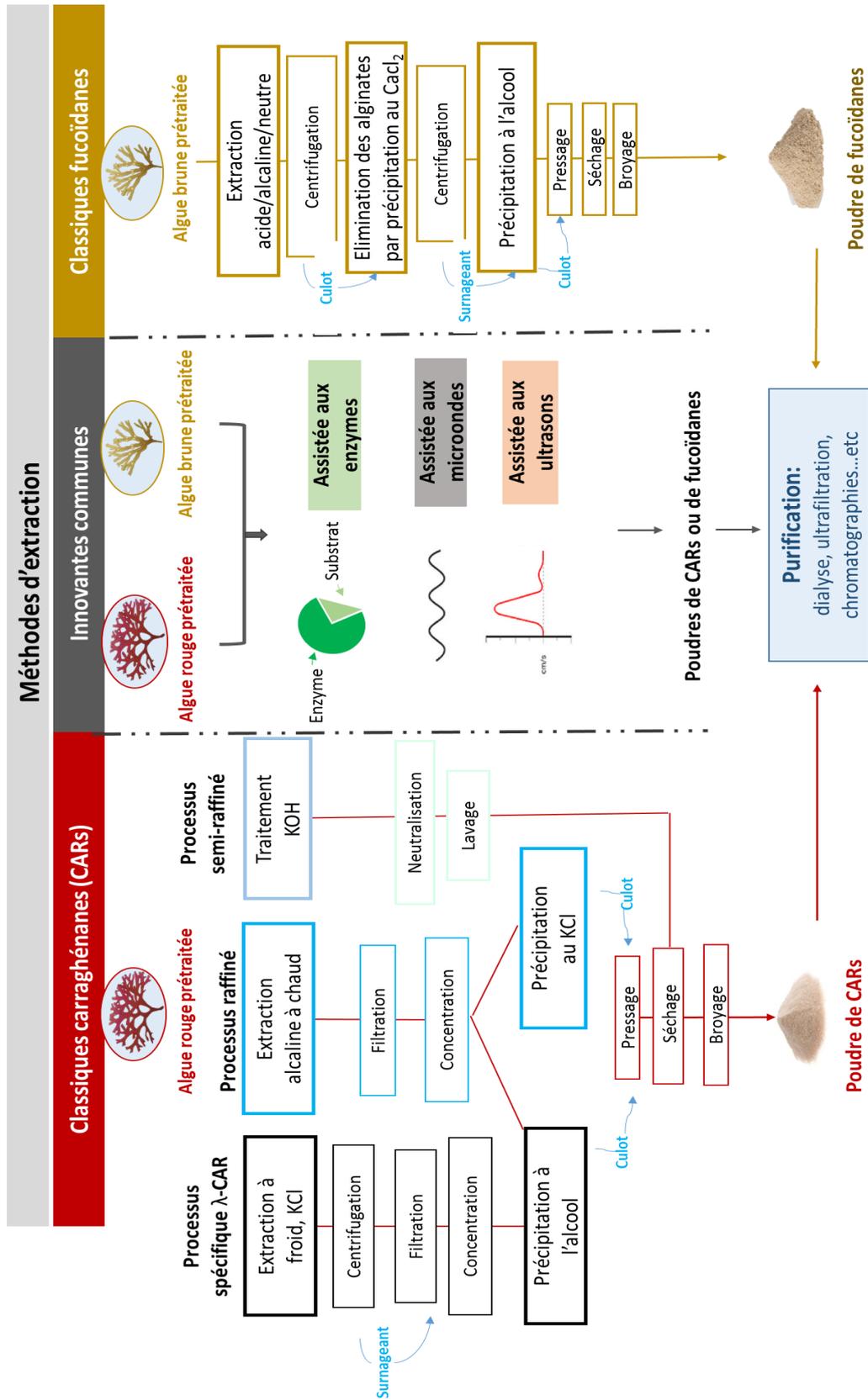


Figure 6. Les différents processus appliqués pour l'extraction des CARs et des fucoïdanes.

---

### 2.3.1. Les méthodes conventionnelles

#### 2.3.1.1. Extractions des carraghénanes à partir des algues rouges

Les méthodes conventionnelles d'extraction des CARs sont conditionnées par les propriétés rhéologiques des différents types de CARs. En effet, comme expliqué précédemment, en industrie, les CARs sont classifiés en CR et en CSR, obtenus par des processus différents. Dans le cas du CR, des étapes de précipitation sont employées permettant de récupérer les CARs. Du côté du CSR, en raison de l'absence d'une étape de précipitation, les CARs sont retenus dans l'algue, expliquant sa teneur plus élevée en cellulose [9,97]. De manière intéressante, il est également possible d'appliquer un processus spécifique pour obtenir du  $\lambda$ -CAR pur.

##### A- Extraction de CARs de type raffiné (CR)

###### - Processus à l'alcool

Il s'agit du premier processus utilisé à l'échelle commerciale [83,97] (**Figure 6**). Les algues sont tout d'abord rincées à l'eau douce afin d'éliminer les impuretés (sable, sel, coquillages). Après séchage au soleil, l'extraction est réalisée à chaud dans un milieu alcalin (ex :  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ) à pH 8-9, pendant 2h [83,110]. Une fois que les CARs sont solubilisés, une étape de filtration est réalisée afin d'éliminer la cellulose et tous résidus de composés insolubles. Une concentration par ultrafiltration ou par évaporation est ensuite réalisée. La collecte des CARs, se fait par précipitation avec un solvant organique, le plus souvent « l'alcool isopropylique ». Par conséquent, les CARs sont précipités, alors que les impuretés restent en solution. Enfin, le pressage, le séchage, suivis d'un broyage permettent d'obtenir une poudre de CARs. Cette méthode est applicable à tous types d'algues et permet donc d'extraire tous types de CARs. Par conséquent, il est clair que si ce processus est appliqué sur une algue dont la synthèse de CARs est cycle dépendante, avec une collecte non contrôlée de la phase de reproduction de ces algues, les chances que le produit final soit un mélange de différents types de CARs, restent élevées. Néanmoins, il s'agit de la seule méthode alternative qui permet d'obtenir du  $\lambda$ -CAR hautement soluble. L'inconvénient de cette méthode, c'est son coût [83].

Comme expliqué précédemment, les conditions alcalines sont utilisées en industrie dans le but de maximiser la conversion de  $\mu$ - et  $\nu$ - CARs en  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs, respectivement, afin d'assurer de meilleures propriétés gélifiantes [84,96,97].

---

- Processus au potassium chloride (KCl)

À la différence de la méthode précédente, la précipitation des CARs est réalisée dans ce cas au KCl. En présence de ce sel et à basse température, la gélification se crée (**Figure 6**). Une étape de déshydratation par pressage du gel. La poudre de CAR est ensuite obtenue après le séchage et le broyage. L'avantage de cette méthode est qu'elle est moins coûteuse que la précédente. En revanche, elle est exclusivement utilisée pour extraire les CARs gélifiants ( $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs) [83,97].

B- Extraction des CARs de type semi-raffiné (CSR)

Dans ce cas, le CAR reste piégé au sein de l'algue, tandis que les autres composés (protéines solubles, minéraux, pigments et acides gras) sont éliminés en solution (**Figure 6**). Ce processus est utilisé à partir d'algues fraîches ou séchées telles que *Kappaphycus alvarezii* ou *Euchema denticulatum*, qui sont soumises à un traitement alcalin (KOH ou  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) pendant 1h. La formation du pont 3,6-anhydro-galactose, nécessaire à la gélification, est favorisée, et quelques groupements sulfates sont libérés. Le traitement alcalin et les lavages vont permettre d'éliminer les résidus minéraux, protéines et acides gras, tout en préservant les CARs et quelques résidus de cellulose dans l'algue. Cette dernière est coupée en petits morceaux, blanchie, séchée et broyée. Parfois, le produit séché est coupé en petits morceaux mais sans l'étape de broyage pour être vendue comme matière première pour la production de CARs raffinés. Ce produit final est appelé « ATC (alkali-treated cottonii) » ou « ATCC (alkali-treated cottonii chips) » ou tout simplement « cottonii chips » [83,97].

C- Extraction spécifique du  $\lambda$ -CAR

Dans cette méthode, il est possible d'extraire sélectivement les CARs en favorisant la solubilité d'un type par rapport à l'autre (**Figure 6**). Par exemple, chez les espèces produisant du  $\lambda$ - et  $\kappa$ - CARs (*Chondrus* et *Gigartina*), il est possible d'effectuer une extraction à froid en présence de KCl. En sachant que la solubilisation du  $\kappa$ -CAR nécessite une haute température, celui-ci va rester piégé dans l'algue, tant que le  $\lambda$ -CAR se retrouvera en solution. À partir de là, la précipitation à l'alcool est appliquée comme expliqué précédemment. Alternativement, le  $\kappa$ -CAR restant dans les résidus d'algues pourrait être récupéré et être soumis au processus semi-raffiné ou raffiné [83]. De nombreux travaux menés sur les  $\lambda$ -CARs à l'échelle académique

appliquent ce fractionnement au KCl [47,111–113], au préalable sur les produits commerciaux ou extraits directement à partir de l'algue. Par exemple, Tiasco *et al.* 2022 ont réussi à faire précipiter le  $\lambda$ -CAR avec une concentration en KCl de 4% [113].

#### 2.3.1.2. Extraction des fucoïdanes à partir des algues brunes

Tout d'abord, la poudre d'algues est rincée à l'éthanol (85%) pour éliminer les impuretés (**Figure 6**). Cela est suivi d'un rinçage à l'acétone, d'une centrifugation et d'un séchage. L'extraction peut se faire ensuite à chaud dans de l'eau distillée pendant 1h [114]. Cette étape peut être répétée plusieurs fois afin d'extraire le maximum de fucoïdanes. Après une étape de centrifugation, une solution de CaCl<sub>2</sub> (1%) est ajoutée afin de précipiter les alginates sous forme d'alginates de calcium insolubles [114]. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et soumis à un traitement à l'éthanol pour faire précipiter les fucoïdanes [114]. Une dernière étape de centrifugation est réalisée, et les résidus de fucoïdanes sont rincés à l'éthanol et à l'acétone, puis séchés [114]. Il est également possible de réaliser cette méthode en remplaçant l'eau distillée par de l'HCl (0,03 M) [114].

#### 2.3.2. Les méthodes innovantes

Malgré l'efficacité des méthodes conventionnelles, elles présentent des inconvénients incluant, un long temps d'extraction, des quantités importantes en solvants et de hautes températures. Cela pourrait induire une désulfatation et une destruction du PS, et donc résultant en un produit de mauvaise qualité [114,115]. Par conséquent, des méthodes innovantes ont été développées afin d'éviter ces contraintes. Parmi elles, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par enzymes et l'extraction assistée par ultrasons sont résumées dans de nombreuses revues [38,83,115–123], et représentées dans la **Figure 6**.

Elles sont également dites « vertes » car elles utilisent peu ou pas de solvants organiques, et certaines d'entre elles sont couramment utilisées pour extraire des substances bioactives et des nanofibres hautement pures à base de plantes [38]. En revanche, leur application sur l'extraction des hydrocolloïdes à partir des algues est encore limitée, par rapport aux méthodes conventionnelles [38,124].

### 2.3.3. Purification des CARs et des fucoïdanes

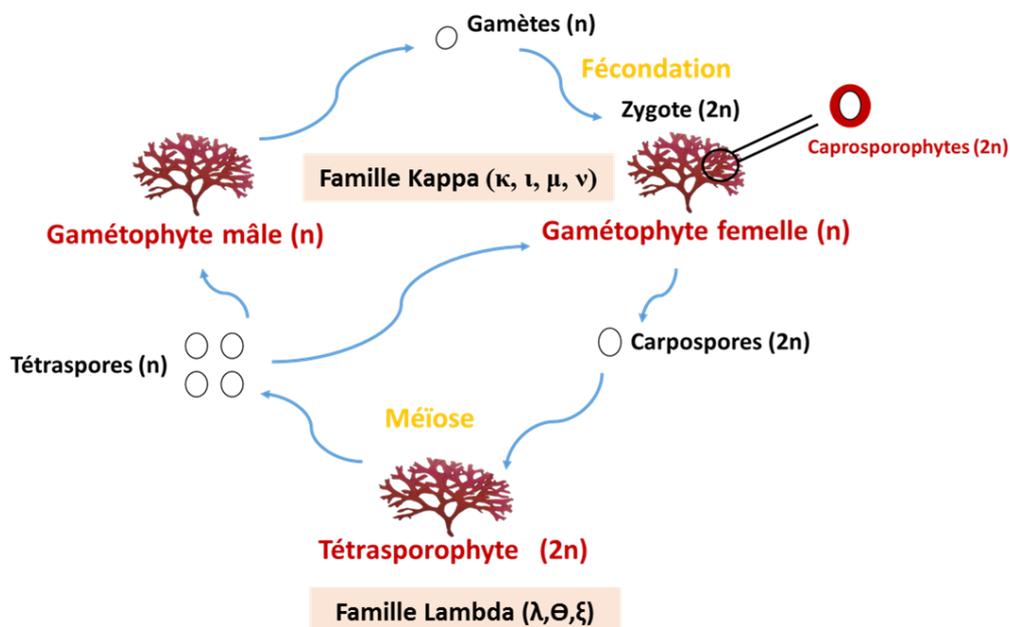
En aval de ces techniques d'extractions, des méthodes de purification (**Figure 6**) peuvent être ajoutées telles que la dialyse ou l'ultrafiltration sur membrane [117,125]. Les techniques les plus poussées utilisent de la chromatographie échangeuse d'anions, d'exclusion stérique et d'affinité, pour purifier les extraits d'algues [122,125–132].

## 2.4. Les facteurs impactant la diversité structurale des CARs et des fucoïdanes

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine d'une variabilité structurale chez les PS d'origine algale. Cela inclu : l'espèce d'algue et son cycle de reproduction, la localisation des PS dans le thalle, l'environnement de la culture de l'algue, ou encore la méthode utilisée pour l'extraction et la primo-purification des PS [9,84,109,133,134]. Bien évidemment, la variation de ces facteurs va avoir une répercussion directe sur le PM, le DS et la composition saccharidique des PS extraits. Par conséquent, cela impacterait les propriétés rhéologiques et biologiques du produit final, et des OS qui en dérivent [135,136].

### 2.4.1. Cas des CARs

#### 2.4.1.1. L'espèce d'algue et son cycle de reproduction

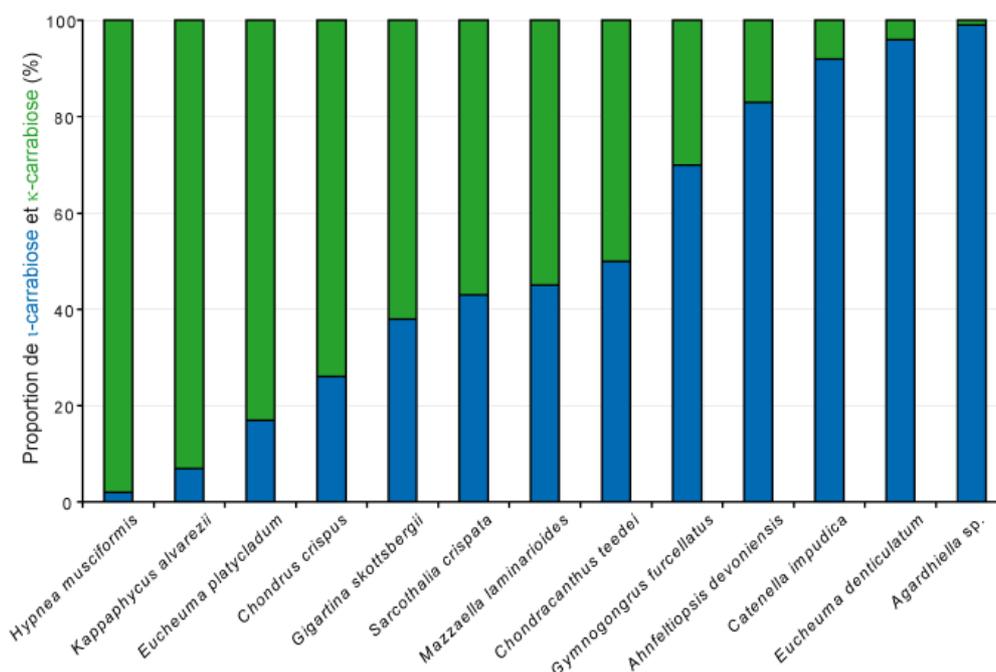


**Figure 7.** Cycle de reproduction de l'algue rouge *Chondrus crispus* (Gigartinaceae) avec les structures dominantes de CARs en fonction de la phase [137].

Comme vu précédemment (**2.1.1. Origine**), la synthèse des CARs peut différer en fonction de l'espèce d'algue. D'un côté, il y a des espèces carraghénophytes qui produisent des structures hybrides contenant des motifs différents au sein d'un même polymère. D'un autre côté, il existe des espèces qui synthétisent un type prédominant de CARs, avec une hybridité sous-exprimée.

Cette variabilité est notamment liée au cycle de reproduction complexe des algues rouges. Il s'agit d'un cycle de type haplodiplophasique trigénétique [137]. Lors de la fécondation, les gamètes (n) libérées par les algues gamétophytes haploïdes mâles et femelles fusionnent et forment des caprosorophytes diploïdes (2n) (**Figure 7**). Après un développement au sein de l'individu femelle, ils vont libérer des carpospores (2n) (**Figure 7**). Ces derniers évoluent en algues tétrasporophytes diploïdes (2n) (**Figure 7**). Après le phénomène de méiose, ces tétrasporophytes libèrent des tétraspores (n), fermant le cycle de reproduction en évoluant en algues gamétophytes mâles ou femelles (**Figure 7**). Chez certaines espèces des familles de Gigartinaceae et de Phyllophoraceae, différentes structures de CARs ont été observées à travers l'évolution du cycle de reproduction. En effet, chez les genres *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea* et *Sarcothalia*, les formes gamétophytes synthétisent des CARs de la famille Kappa ( $\kappa$ -,  $\iota$ -,  $\mu$ -,  $\nu$ -), essentiellement sous forme hybride, c'est-à-dire contenant deux types couplés au sein de la même chaîne :  $\kappa$ -/ $\iota$ - CARs [180]. Les formes tétrasporophytes produisent majoritairement des CARs de la famille Lambda ( $\lambda$ -,  $\Theta$ -,  $\pi$ -,  $\xi$ -) [138–140], où des structures hybrides composées de  $\lambda$ -,  $\Theta$ -,  $\pi$ -,  $\xi$ - CARs peuvent également être présentes [141]. Il est important de noter que les formes gamétophytes et tétrasporophytes sont semblables macroscopiquement. Par conséquent, les CARs industriels commercialisés sont souvent un mélange de familles Kappa et Lambda, avec une proportion cycle-dépendante [38].

Néanmoins, cette variation des types de CARs en fonction du cycle de reproduction n'est pas toujours valable. Par exemple, chez la famille Soleriaceae, certaines espèces synthétisent majoritairement un seul type de CARs [142]. En effet, les espèces *Kappaphycus alvarezii* et *Euclima denticulatum*, sont connues pour produire respectivement des CARs de types  $\kappa$ - et  $\iota$ -, quel que soit le stade de reproduction, avec néanmoins la présence minoritaire de structures  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs dans les échantillons de  $\iota$ - et  $\kappa$ - CARs respectivement [143]. De plus, chez ces espèces, il faut également rappeler la présence de faibles quantités des précurseurs de  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs, à savoir, le  $\mu$ - et  $\nu$ - CARs, respectivement [84,97].



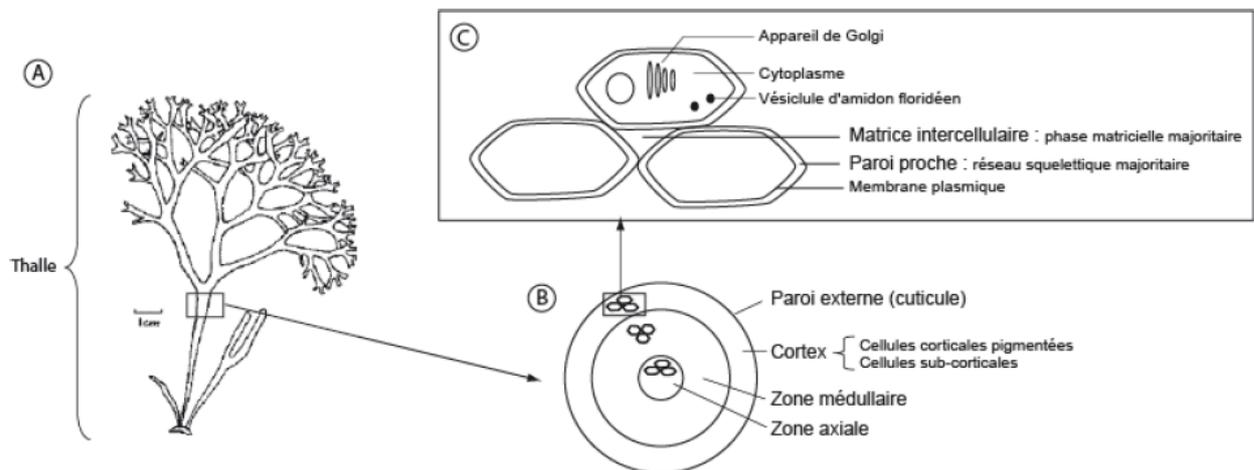
**Figure 8.** Diagramme de Stancioff [77,144].

L'hétérogénéité liée aux motifs hybrides  $\kappa/\iota$ - CARs est variable selon les espèces. Elle est illustrée dans le diagramme de Stancioff (**Figure 8**) [144]. Ce dernier rassemble les espèces d'algues rouges à partir desquelles des motifs hybrides disaccharidiques  $\kappa/\iota$ -CARs sont extraits [145,146]. Cette variabilité a notamment une répercussion sur les propriétés rhéologiques et biologiques. En effet, une étude a montré que les propriétés fonctionnelles d'un hybride de  $\kappa/\iota$ -CARs (à un ratio de 50 :50 ou 70 :30) étaient différentes de celles des CARs pratiquement purs de structure  $\kappa$ - ou  $\iota$ -, ou encore de celles d'un mélange de même ratio de ces deux polymères (pratiquement purs) [147].

D'autres structures hybrides peuvent également exister. Par exemple, chez les espèces d'algues *Eucheuma gelatinae* [91] et *Furcellaria lumbricalis* [148], des structures hybrides composées de motifs  $\kappa/\beta$ - et  $\kappa/\gamma$ - carrabioses, ont été retrouvées respectivement, et cela indépendamment du cycle de reproduction de l'algue. Grâce à l'hydrolyse enzymatique, ces structures hybrides retrouvées au sein des CARs ont pu être explorées [142,149,150]. Enfin, cette diversité structurale s'élargit encore chez certaines espèces d'algues rouges, capables de synthétiser des structures hybrides composées de CARs et d'agar appelées « carragars » [151].

### 2.4.1.2. La localisation dans le thalle

Grâce à une technique spécifique d'immunofluorescence avec des sondes d'hybridation à base d'oligosaccharides ( $\kappa$ - et  $\iota$ -) couplées à des fluorochromes, la localisation spécifique des CARs natifs ( $\kappa$ - et  $\iota$ -) a pu être déterminée chez l'espèce *Kappaphycus alvarezii* [152]. Le type  $\kappa$ -CAR a été retrouvé dans la matrice intercellulaire et la paroi des cellules de la zone axiale, de la zone médullaire et du cortex (**Figure 9**). En revanche, le signal était très faible au niveau de la zone épidermique et de la paroi externe, dans lesquelles le type  $\iota$ -CAR, minoritaire chez cette espèce, a été détecté [152]. Ces résultats confirment que la structure des CARs est susceptible de varier selon leur localisation dans le thalle de l'algue. Également, la distribution des différents types de CARs au sein de la paroi cellulaire des algues a pu être localisée grâce à des anticorps monoclonaux [153].



**Figure 9.** Organisation de la paroi des algues rouges [77]. (A) Thalle de l'algue rouge. (B) Coupe transversale de thalle. (C) Organisation des cellules de la paroi des algues.

### 2.4.1.3. Les conditions culturelles des algues

L'environnement marin dans lequel l'algue est cultivée est défini par la localisation géographique, la saison de récolte, la température, la salinité, le pH et l'exposition à la lumière [134]. Durant leur développement, les algues sont systématiquement exposées à ces changements environnementaux. La saison à laquelle l'algue est récoltée est un facteur déterminant de la structure des CARs, mais également du rendement d'extraction, qui reste plus important lors des récoltes en saison estivale [154]. À titre d'exemple, le ratio en motifs  $\kappa$ - et  $\iota$ -carrabioses chez l'espèce *Kappaphycus alvarezii*, va varier en fonction de sa récolte en Philippines, en Indonésie, ou en Tanzanie (**Tableau 3**). Également, chez l'espèce *Eucheuma*

*denticulatum*, lorsqu'elle est récoltée à Madagascar, un CAR hybride est produit avec seulement des motifs ι- et ν-carrabioses (**Tableau 3**). En revanche, si elle est récoltée en Tanzanie à la même saison, des motifs de κ-carrabioses s'ajoutent au polymère [154].

**Tableau 3.** Composition en CARs de diverses algues en fonction de la saison de récolte [154]. \*: espèces soumises à une culture pendant une certaine durée. \*\*: rendement exprimé en pourcentage de masse sèche. \*\*\*: extraction à l'eau distillée. **G**: gamétophyte. **T**: tétrasporophyte. **NF**: non fertilisé. **GF**: gamétophyte femelle.

Famille	Espèce	Phase cycle reproduction	Saison de la récolte	Origine	CARs			
					Rendement**	Extraction alcaline	Ratio ι/κ	Extraction native***
Solieriaceae	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	-	Octobre-février	Indonésie	20,0	κ/ι	0,64	κ/ι (μ)
			Octobre-février	Philippines	30,4	κ/ι	0,72	κ/ι
			Juin-octobre	Philippines	68,0	κ/ι	0,7	κ/ι
			Hiver	Tanzanie	18,7	κ/ι	0,69	κ/ι
			2 semaines*	Mexico	58,1	κ/ι	0,8	κ/ι
			3 semaines*	Panama	-	-	0,59	κ/ι
	<i>Euchemum denticulatum</i>		Octobre-février	Philippines	39,7	ι	0,92	ι (ν)
			Fin du printemps	Madagascar	35,3	ι	0,93	ι (ν)
			Printemps	Tanzanie	31,5	ι/κ	0,88	ι/κ (ν)
Giartinaceae	<i>Chondrus crispus</i>	G + T	Fin du printemps	Canada	33,8	κ/ι λ	-	κ/ι (μ/ν) λ/α
		NF	Hiver	Buarcos (Portugal)	14	κ/ι	0,59	κ/ι (μ)
		T	Printemps	Buarcos (Portugal)	36,6	λ	-	λ
		GF	Fin hiver	Buarcos (Portugal)	23,2	κ/ι	0,53	κ/ι (μ)
		GF	Fin du printemps	Buarcos (Portugal)	35,0	-	-	κ/ι (μ)
	<i>Gigartia pistillata</i>	NF	Fin du printemps	Viana do Castelo (Portugal)	65,4	κ/ι	0,69	κ/ι (μ/ν)
		T	Printemps	Buarcos (Portugal)	55,6	ξ-λ	-	-
		GF	Printemps	Buarcos (Portugal)	49,8	κ/ι	0,69	κ/ι (μ/ν)

#### 2.4.1.4. Les méthodes d'extractions utilisées

La composition et la structure des CARs peut également être fortement influencée par le type et les conditions de la méthode d'extraction utilisée. Les différents processus pour extraire les CARs des algues rouges vu auparavant (**voir 2.3** de cette **étude bibliographique**) avaient parfaitement expliqué qu'il est plus ou moins possible d'orienter la méthode d'extraction en fonction du type de CARs souhaité. Comme déjà expliqué, le fait que la production des types de CARs soit dépendante du cycle de reproduction de certaines espèces d'algues rouges, ajoute une certaine difficulté lors de l'extraction. En effet, comme les formes gamétophytes et tétrasporophytes de ces algues sont récoltées ensemble, la composition en types de CARs va être différente selon le processus d'extraction employé. Par exemple, pour obtenir spécifiquement des  $\lambda$ -CARs, il faudra impérativement réaliser une extraction à froid en présence de KCl afin de les séparer des CARs gélifiants ( $\kappa$ - et  $\iota$ -). De même, si l'extraction est réalisée à chaud dans un milieu alcalin, et avec une précipitation à l'éthanol, dans ce cas, les différents types de CARs seront obtenus ensemble (**voir 2.3** de cette **étude bibliographique**).

#### 2.4.2. Cas des fucoïdanes

##### 2.4.2.1. L'espèce d'algue, la localisation dans le thalle et le cycle de reproduction

Velu *et al.* 2017 ont étudié la variation du DS et de la quantité en fucose dans le fucoïdane extrait de quatre espèces d'algues brunes, incluant, *Sargassum wightii*, *Sargassum oligocystum*, *Padina tetrastromatica* et *Turbinaria ornata*, dans lesquelles ils ont confirmé la présence du fucose en tant que composé majoritaire [114]. L'espèce *Padina tetrastromatica* contenait le pourcentage le plus élevé en fucose ( $54,51 \pm 1,08\%$ ), suivi de l'espèce *Turbinaria ornata* ( $51,76 \pm 1,43\%$ ). Le DS quant à lui, était plus élevé chez l'espèce *Turbinaria ornata* ( $24,27 \pm 0,85\%$ ), suivi de l'espèce *Padina tetrastromatica* ( $22,70 \pm 0,53\%$ ).

Skriptsova *et al.* 2012 ont comparé dans cinq espèces différentes d'algues brunes la quantité et la structure des fucoïdanes entre ceux contenus dans les tissus fertiles (sporophylle) et ceux issus des tissus stériles (fronde) [155]. Les résultats ont montré que les rendements les plus élevés sont obtenus à partir des tissus reproductifs de ces espèces d'algues. La composition monosaccharidique (fucose, mannose, galactose, etc) pouvait également varier (selon l'espèce) en fonction du tissu utilisé. Par exemple, les pourcentages en fucose et en galactose étaient plus élevés chez les fucoïdanes extraits des tissus reproductifs des espèces *Sargassum pallidum* et

---

*Alaria ochotensis*, par rapport à ceux extraits de la partie stérile. De plus, il a été remarqué que les tissus fertiles offrent des fucoïdanes ayant moins d'hétérogénéité en terme de composition monosaccharidique. Des résultats similaires ont été obtenus dans les travaux de Mak *et al.* 2013, portés sur le fucoïdane de l'espèce *Undaria pinnatifida* [156].

#### 2.4.2.2. Les conditions culturelles de l'algue

En 2017, Fletcher *et al.* ont démontré que l'automne était la période optimale pour obtenir le meilleur rendement en fucoïdanes extraits à partir des algues brunes *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus* et *Ascophyllum nodosum* [157]. Dans cette étude, cette variation saisonnière a également eu un fort impact sur les pourcentages de fucofucosides et de sulfates. Par exemple, chez l'espèce *Fucus vesiculosus*, ils ont atteint leur maximum durant le mois de novembre, jusqu'à 39 % de fucofucose et 35 % de sulfates.

#### 2.4.2.3. Les méthodes d'extraction et de purification

Zayed *et al.* 2016 ont réalisé une étude comparative de l'effet de la méthode d'extraction et de purification sur les caractéristiques structurales du fucoïdane extrait de l'espèce *Fucus vesiculosus* [136]. Deux procédures d'extraction du fucoïdane ont été employées : dans la première (A) une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$  (1% p/v) à 60°C pendant 6h à pH 2 a été utilisée, et dans la seconde (B), le  $\text{CaCl}_2$  a été solubilisé dans le tampon MAB (d'acide maléique) à pH 1, suivies par la récupération du fucoïdane avec une précipitation à l'éthanol. Par la suite, une procédure de purification a été réalisée, consistant en l'immobilisation du bleu de toluidine (colorant cationique) sur des billes aromatiques, permettant de capturer les composés anioniques par des liaisons électrostatiques. Cette procédure a été réalisée différemment pour obtenir deux fractions distinctes : la F-6 en mettant la poudre de fucoïdane obtenue par la procédure d'extraction A, et solubilisée dans le tampon MES (d'acide morpholino éthanesulfonique) à pH 6, puis mise en contact avec les billes aromatiques ; et la F-M en mélangeant directement la poudre de billes dérivées avec la solution de fucoïdane obtenue par la procédure d'extraction B. Les analyses structurales de ces fractions ont révélé que par rapport à la fraction F-6, la fraction F-M avait un DS (36,28% vs 29,49 %) plus élevé et un  $M_n$  plus faible (26 kDa vs 54 kDa). Également, le fucofucose a été détecté dans les deux fractions à plus de 80%, avec une plus grande proportion pour la F-M (92,43 %).

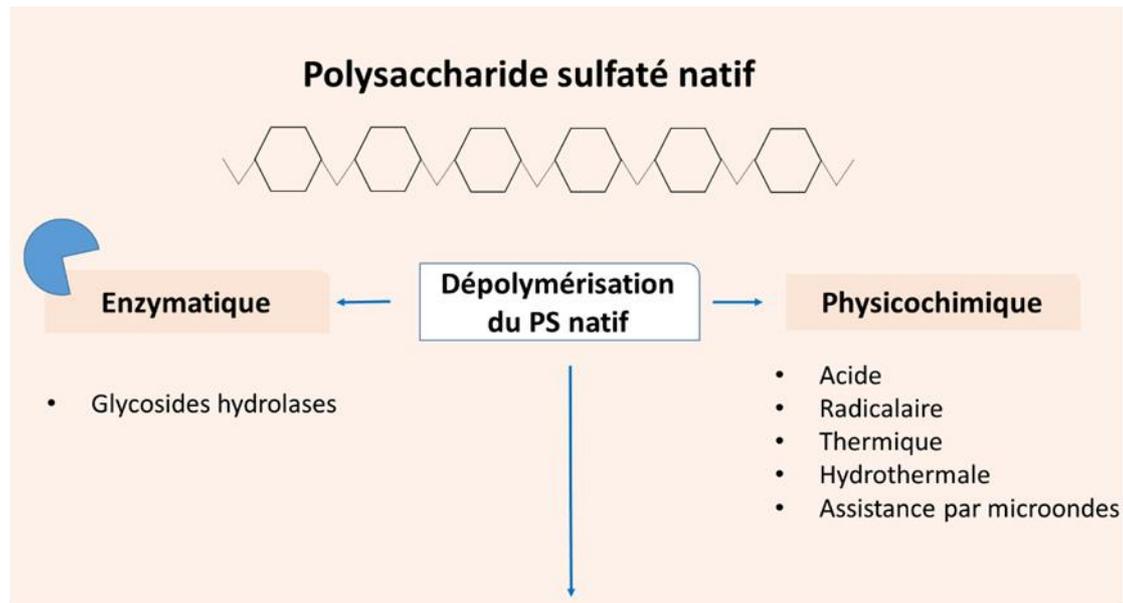
---

Dans une autre étude, il a été démontré que la purification graduelle des fucoïdanes à l'éthanol permet d'augmenter les pourcentages de fucoses et de sulfates [158].

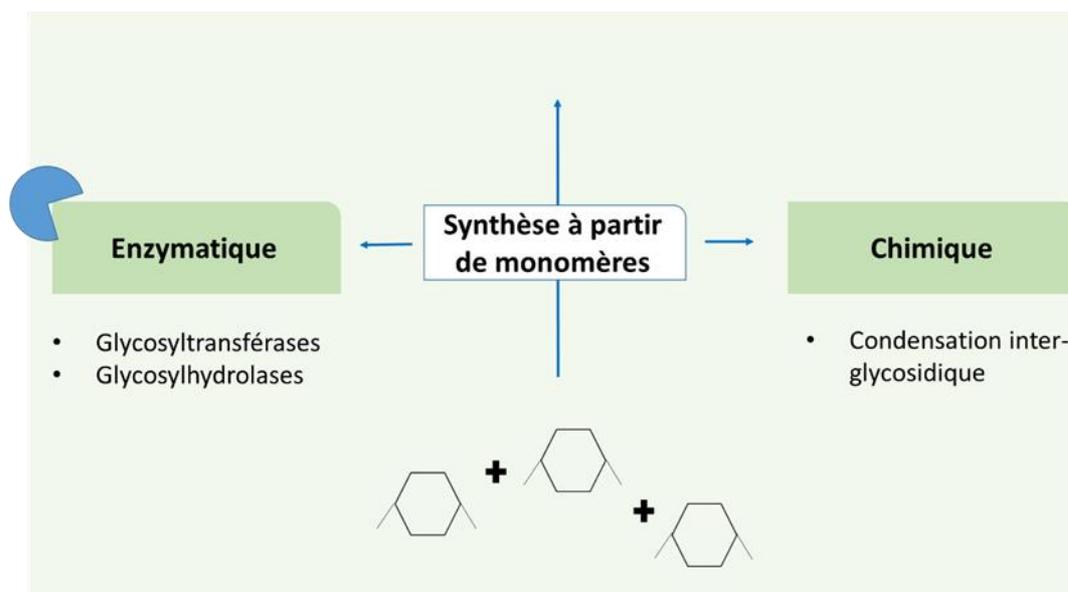
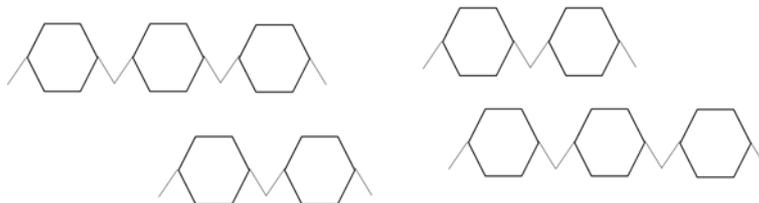
## 2.5. Les méthodes d'obtention des $\lambda$ -COs et des F-Os

A la vue des contraintes précédemment évoquées concernant les PS natifs de  $\lambda$ -CARs et de fucoïdanes (faible solubilité, haute viscosité, activités adverses et faible biodisponibilité) entravant leur application clinique, la conception d'OS (PM, DS et structure contrôlés) pourrait constituer une solution pour faciliter leur transfert comme explicité en **Introduction générale**. Ils sont définis par convention pour avoir un degré de polymérisation (DP) compris entre 2 et 25 résidus [30].

Dans cette partie, les méthodes d'obtention d'OS par dépolymérisation à partir du PS natif, incluant des méthodes physicochimiques et enzymatiques seront discutées (**Figure 10**). D'autre part, la synthèse totale par voie chimique ou enzymatique sera également présentée (**Figure 10**). Parmi les méthodes physicochimiques, la dépolymérisation radicalaire au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est celle que nous avons appliquée dans ces travaux de thèse. Chaque méthode sera illustrée tout d'abord par un exemple de production d'héparines de BPM, appliquée à l'échelle industrielle quand cela est possible. Les héparines de BPM sont des analogues structuraux de nos OS d'intérêts et font office de sucres de référence car ce sont les premiers et, à l'heure actuelle, les seuls OS sulfatés d'origine naturelle commercialisés pour des applications pharmaceutiques en tant qu'antithrombotiques [159]. Le fait que l'héparine de BPM produite par dépolymérisation à partir du PS natif ou par synthèse chimique totale, soit le seul OS produit à l'échelle industrielle, montre les difficultés que rencontrent les OS pour accéder à cette étape. Dans un second temps, des exemples d'études appliquées à la conception de  $\lambda$ -COs et de F-Os, nos sucres d'intérêt, seront détaillés. En revanche, lorsqu'une méthode donnée n'a pas été appliquée pour produire les  $\lambda$ -COs, des exemples d'autres types de CARs sont présentés.



**Oligosaccharides sulfatés**

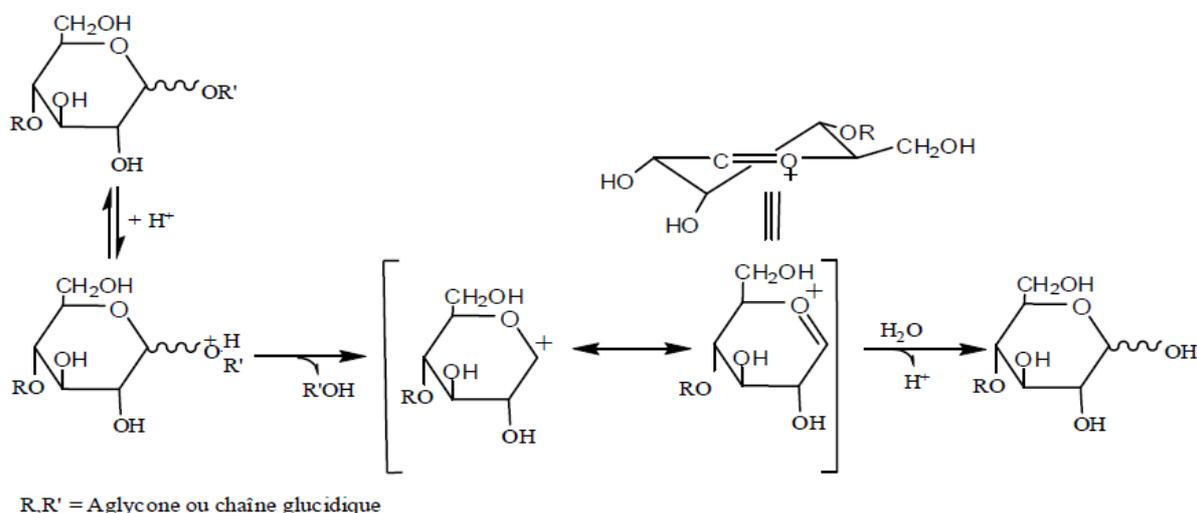


**Figure 10.** Schéma récapitulatif des méthodes de conception d'oligosaccharides sulfatés.

## 2.5.1. Par dépolymérisation du polysaccharide natif

## 2.5.1.1. Les méthodes physicochimiques

## A- Hydrolyse acide



**Figure 11.** Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides [160].

## - En milieu liquide

Dans ce type d'hydrolyse, de nombreux acides dilués ou concentrés (jusqu'à 2M) peuvent être utilisés tels que, l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>), l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), l'acide trifluoroacétique (TFA, C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>), l'acide tartrique (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>), avec un chauffage entre 50 et 90°C [32]. Le mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides est représenté dans la **Figure 11**. Le clivage se fait grâce au proton « H<sup>+</sup> » qui catalyse la réaction en interagissant avec l'oxygène de la liaison glycosidique, connue pour sa très forte sensibilité à l'hydrolyse [160,161]. Cela résulte en un acide conjugué, qui va former un cation carbonium cyclique intermédiaire par le clivage de la liaison C-O [160,161]. Un autre mécanisme moins fréquent peut avoir lieu par la protonation de l'oxygène du cycle [160,161]. Le carbocation étant instable et très réactive, se stabilise en perdant un proton par hydratation pour former une nouvelle extrémité réductrice [160,161].

La sensibilité aux conditions d'hydrolyses acides dépend en grande partie de la structure du sucre, en particulier des groupements de substitutions, mais aussi de la position de la liaison glycosidique et de l'anométrie. Cette méthode est également décrite pour sa non spécificité et sa production d'une large diversité d'oligomères [30,32,162]. Les variations de températures,

de temps de réaction, ou de concentration en acide, sont clés pour la production d'OS mais peuvent induire la modification de la structure du sucre, et provoquer une forte désulfatation selon certains auteurs [30,32,162]. Par conséquent, le choix de l'agent acide et le contrôle des différents paramètres de la réaction est très important lors des stratégies de criblage d'OS bioactifs contre une cible, et ces facteurs doivent être systématiquement mis en perspective pour comparer plusieurs études entre elles. Par exemple, en 2008, Yang *et al.* ont étudié l'effet des conditions d'hydrolyse sur l'activité anti-cancéreuse des F-Os obtenus à partir d'un fucoïdane de l'algue brune *Undaria pinnatifida*, sur la lignée cellulaire humaine du cancer du poumon A549 [49]. L'hydrolyse du fucoïdane natif ( $M_w = 5100$  kDa) a été réalisée à l'HCl (0,01 N) en appliquant soit un chauffage à l'eau bouillante (100 °C), soit aux microondes (pas d'étape de purification après hydrolyse). Un test colorimétrique de la densité cellulaire réalisée sur les cellules A549 a montré que la dépolymérisation à l'HCl avec un chauffage à l'eau bouillante améliorait l'activité anti-cancéreuse des F-Os en comparaison du fucoïdane natif. En revanche, les F-Os obtenus par une hydrolyse à l'HCl aux microondes, n'a montré qu'une faible augmentation de cette activité, en comparaison des formulations de PM similaires obtenus par chauffage conventionnel. Ces résultats indiquent que la diminution du PM du fucoïdane permet d'améliorer son activité anti-cancéreuse, mais d'une manière dépendante des conditions d'hydrolyse appliquées.

Le  $\lambda$ -CAR et le fucoïdane semblent avoir des structures qui répondent bien à l'hydrolyse acide en condition forte ou ménagée, comme en témoignent les nombreux articles l'ayant utilisée [28,29,32]. Par exemple, grâce à une hydrolyse au TFA (0,1 M), Calvo *et al.* 2019 ont réussi à produire un  $\lambda$ -CO d'une taille de 27,2 kDa [111]. Également, Tang *et al.* 2023 ont réussi à produire un  $\lambda$ -CO de 1,8 kDa par une dépolymérisation acide à l'HCl (0,05 M) du  $\lambda$ -CAR natif [163]. Un F-O de 18,6 kDa a pu être généré par une hydrolyse au H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) par Haroun-Bouhedja *et al.* 2000 [164], et un autre F-O de 800 Da a été produit grâce à une hydrolyse à l'HCl (0,01 N) du fucoïdane natif par Hwang *et al.* 2017 [165].

- Supportée (autohydrolyse)

En plus de l'hydrolyse acide classique faisant recours aux agents chimiques en solution, un autre type existe, dit « solide ou supportée » pour obtenir des dérivés OS. Cette méthode fait recours à des résines commercialisées telles que les Amberlyts échangeuses de cations (exemple: Amberlyst 70, Amberlyst 15) [166,167]. Ces dernières sont composées de

groupements fonctionnels acide fort « SO<sub>3</sub>H », formant un site catalytique actif en fournissant un proton provoquant l'hydrolyse de la liaison glycosidique [166,167].

Cette méthode a été également appliquée pour la production de  $\lambda$ -COs et de F-Os bioactifs. Par exemple, Chen *et al.* 2007 ont réussi à obtenir un  $\lambda$ -CO de 3,4 kDa après avoir mélangé la solution du  $\lambda$ -CAR natif avec de la résine échangeuse de cations, suivi d'une incubation à 90°C pendant 6h [168]. Anastyuk *et al.* 2017, ont réalisé une dépolymérisation d'un fucoïdane natif (80 kDa) avec cette méthode à 37 °C, pendant 24h, 48h et 72h, ayant permis de générer des formulations de 30, 26 et 18 kDa, respectivement [130]. D'autres exemples sont illustrés dans la revue de Flórez *et al.* 2018 [123].

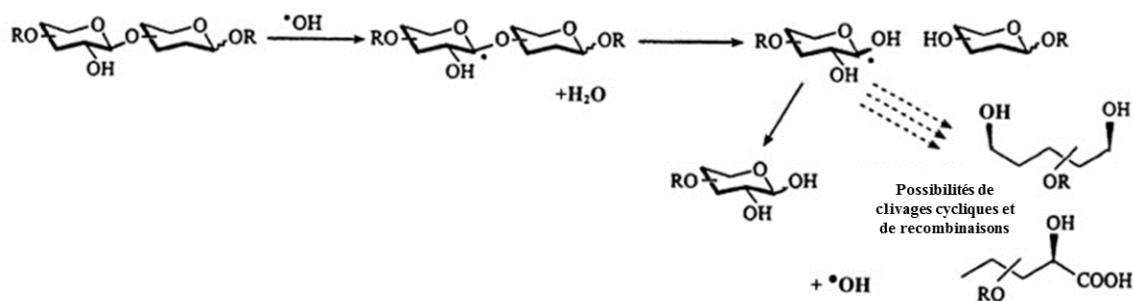
### B- Dépolymérisation radicalaire

Dans ce cas, l'hydrolyse se fait en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), qui se dissocie en solution pour former des radicaux libres hydroxyles (·OH) [30,31]. En raison de leur haute réactivité et instabilité, ces derniers sont capables de cliver les liaisons glycosidiques [30].

Généralement, la dégradation ne se fait pas en présence d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul, car cela nécessiterait une concentration relativement élevée de celui-ci [169]. Par conséquent, des études ont été réalisées afin d'optimiser cette dégradation. Tout d'abord, il a été découvert que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pouvait être activé par le Fe<sup>2+</sup>, jouant le rôle de catalyseur de la décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afin de produire les radicaux libres [169]. Par la suite, l'utilisation de Cu<sup>2+</sup>, d'acide ascorbique, d'enzymes, de matériaux riches en électrons, de semi-conducteurs, de matériaux plasmoniques ou encore l'application de divers traitements (lumière, micro-ondes, ultrasons, etc) ont été découverts comme activateurs potentiels, provoquant ainsi la dégradation de matériaux organiques [169]. Dans le cadre de la dégradation des PS, ces méthodes n'ont pas été toutes appliquées. Jusqu'à présent, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combiné à l'acide ascorbique, aux ions métalliques (comme Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup>), à certaines enzymes (comme la peroxydase, les monooxygénases polysaccharidiques lytiques), et à l'irradiation au plasma ont été utilisées [169].

A l'échelle industrielle, la dépolymérisation radicalaire est déjà utilisée pour la production de l'héparine de BPM commercialisée sous le nom **Normiflo®**. Concernant nos PS d'études, à notre connaissance, seule notre équipe a utilisé cette méthode pour produire des  $\lambda$ -COs. Nous avons pu obtenir une large gamme de  $\lambda$ -COs en diminuant le PM du  $\lambda$ -CARs natif jusqu'à 2,8 kDa, après 72h de temps de dépolymérisation à 60°C avec un ratio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ $\lambda$ -CAR

natif de 1,5 (*m/m*) [48]. Également, un  $\lambda$ -CO de 11 kDa a été généré en assistant la méthode radicalaire avec des ultrasons [72]. En revanche, la dépolymérisation au  $H_2O_2$  a largement été appliquée sur d'autres types de CARs, dont certains travaux ont étudié l'impact de la concentration, de la température, et du pH, sur la production de COs [170–175]. Les F-Os ont également été largement produits grâce à cette méthode à partir du PS natif issu de différentes espèces [29,176–178].



**Figure 12.** Mécanisme de la dépolymérisation radicalaire des PS avec une possible ouverture cyclique [30].

Malgré l'efficacité de cette méthode à diminuer le PM, tout comme l'hydrolyse acide, le clivage est non spécifique et induit également une désulfatation importante par rapport aux PS natifs [48,58,179]. De plus, une altération du cycle [30,31], ou la création de nouvelles fonctions peut survenir [169] (**Figure 12**). Ces modifications peuvent avoir un impact positif comme négatif, sur l'activité biologique d'intérêt [51]. Ainsi, il est très important de prendre cela en considération lors de l'interprétation des études structures-fonctions.

### C- Hydrolyse hydrothermale et dégradation thermique

La dégradation thermique entraîne un clivage aléatoire et de nombreux réarrangements (déshydratation, groupes furfurals, etc) dont les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés [180]. Elle est souvent adossée à l'hydrolyse hydrothermale qui est réalisée en présence de l'eau uniquement, qui sous certaines conditions de pression et de température, peut agir comme agent d'hydrolyse à travers son caractère ampholyte [181]. Ce dernier désigne la capacité des molécules d'eau à jouer le rôle d'acide et de base, notamment lorsque les conditions favorisent leur auto-ionisation sous forme d'ions hydroniums ( $H^+$ ) et hydroxyles ( $OH^-$ ), permettant ainsi de catalyser des réactions acides ou basiques [181]. La formation de ces ions se fait dans des conditions de hautes températures. Lorsque la température de l'eau est

$>200^{\circ}\text{C}$ , on parle d'un état sous-critique [181]. Tant dis qu'à des températures qui excèdent  $374^{\circ}\text{C}$ , et à des pressions  $>218\text{ atm}$ , l'eau est dans un état super-critique [181]. Par conséquent, l'eau hautement chauffée permet d'appuyer des réactions chimiques telle que la dépolymérisation radicalaire [181].

L'application de la dégradation thermique ou hydrothermale a été appliquée sur des CARs et des fucoïdanes. Par exemple, dans les travaux de Eha *et al.* 2021, une dégradation thermique (de 1059 à 1009 kDa) de CARs commerciaux (mélange de  $\kappa$ - et  $\lambda$ - CARs) a été observée en fonction de l'augmentation de la température ( $75$ - $115^{\circ}\text{C}$ ) [182]. Dans un travail réalisé par Cicinskas *et al.* 2020, une hydrolyse hydrothermale d'une solution CAR après 24h à  $37^{\circ}\text{C}$  a été étonnamment reportée, produisant des  $\lambda$ -COs compris entre 10-170 kDa [112]. Concernant les F-Os, en 2012, Azuma *et al.* ont incubé une solution aqueuse de fucoïdane natif à  $140^{\circ}\text{C}$  pendant 15–60 min, donnant des F-Os compris entre 6,5 et 40 kDa [183]. Dans le même travail, un traitement à  $140^{\circ}\text{C}$  pendant 5–8 min avait permis d'obtenir des formulations de PM intermédiaires allant entre 110–138 kDa. Ils ont constaté que durant ces conditions, toutes les formulations avaient préservé leurs DS. Également, en 2018, Lahrsen *et al.* ont démontré que la dégradation hydrothermale du fucoïdane de l'espèce *Fucus vesiculosus* a permis de réduire son PM de 38,2 kDa à 10,3 kDa, après 90 min à  $120^{\circ}\text{C}$  [51].

Contrairement à l'hydrolyse acide ou à la dépolymérisation radicalaire, l'hydrolyse thermique ou hydrothermale n'utilise aucun catalyseur chimique, la rendant très avantageuse. En revanche, le temps de réaction peut être long, si la température de l'eau n'est pas sous ou super-critique. Il est également possible de remarquer que dans les exemples présentés ci-dessus la température de l'eau était  $< 200^{\circ}\text{C}$ , afin d'éviter des modifications de la structure primaire du sucre [184,185]. Néanmoins, comme mentionné précédemment de nombreux sous-produits de dégradation peuvent être créés.

#### D- Hydrolyse assistée aux microondes

L'hydrolyse assistée par des irradiations sous microondes a pris un intérêt considérable par rapport aux méthodes conventionnelles. En effet, elle permet de faciliter les différentes techniques d'hydrolyse chimique présentées ci-dessus, pour une meilleure efficacité, rapidité et faible coût [30,32]. Le chauffage par microondes permet une distribution uniforme de la

---

chaleur, limitant les gradients de température, grâce aux mouvements et aux forces de friction intermoléculaires produites par les molécules ayant subi l'irradiation [186].

L'utilisation des microondes a notamment servi pour appuyer les méthodes de dégradation hydrothermales utilisées pour l'obtention de  $\lambda$ -COs et de F-Os, expliquées précédemment. Par exemple, une étude a permis de générer deux  $\lambda$ -COs de 15 et de 9,3 kDa, après un traitement aux microondes pendant 3 et 6 min respectivement (pression de 15 atm) [47]. Cette dépolymérisation a notamment été marquée par une désulfatation limitée. Le DS était de 29,1 % pour le  $\lambda$ -CAR natif (PM= 652 kDa), et de 27,8 et 21,8 %, respectivement pour les  $\lambda$ -COs de 15 et 9,3 kDa. L'hydrolyse hydrothermale assistée par microondes a également été appliquée pour produire des F-Os. Par exemple, à 200 °C pendant 5 min, le PM d'un fucoïdane natif (PM > 780 kDa) extrait de l'espèce *Undaria Pinnatifida* a pu être réduit à 23,6-37,6 kDa [187].

En revanche, nous n'avons pas trouvé d'études appliquées aux  $\lambda$ -CARs ni aux fucoïdanes utilisant les microondes pour assister les méthodes utilisant un agent chimique. Cependant, des exemples sur d'autres types de CARs existent. Par exemple, récemment en 2020, Chen *et al.* ont réalisé une dépolymérisation au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assistée par microondes, d'un extrait de polysaccharides sulfatés de l'espèce d'algue rouge *Grateloupia livida*, très utilisée pour extraire les CARs au Japon, Chine et en Corée du sud [188]. Après 34 min de réaction à 54°C et avec une concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 3 mM, le PM a été réduit de 23 044 à 945 kDa avec une bonne préservation du DS. Également, l'hydrolyse acide assistée aux microondes a été utilisée sur les  $\kappa$ -CARs. Dans un autre exemple, Tang *et al.* 2013 ont réalisé une dépolymérisation acide par l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M) assistée aux microondes d'un  $\kappa$ -CAR à des temps et fréquences différentes, ce qui leur a permis d'obtenir une gamme de  $\kappa$ -COs comprise entre 1,4-50 kDa [189].

Il faut noter, que l'utilisation des microondes ne semble pas modifier la spécificité ou non des sites de coupure hydrolytiques inhérentes à chaque technique [32].

#### E- Autres méthodes de dépolymérisation physicochimiques

Plusieurs autres méthodes de dépolymérisation plutôt dites « physiques » ont été développées pour obtenir des OS. Parmi elles, la dégradation par ultrasons, les méthodes d'irradiation incluant les radiations ultraviolettes et l'irradiation gamma [190]. Les études

suggèrent qu'il est généralement compliqué d'obtenir des OS à la taille voulue en utilisant une seule méthode physique, avec des PM qui ne descendent pas en dessous de 50 kDa [190]. Il serait donc préférable de combiner plusieurs méthodes pour obtenir les PM désirés [190]. Des exemples de production de COs et de F-Os par ce type de méthodes sont résumés dans plusieurs récentes revues [28,29,190].

#### 2.5.1.2. Méthodes enzymatiques

De manière générale, les méthodes enzymatiques présentent de nombreux avantages par rapport aux méthodes non enzymatiques. En effet, grâce à leur sélectivité, elles assurent une meilleure homogénéité des formulations avec moins de sous-produits générés ou encore une meilleure préservation de la structure de base [32,191]. Les réactions enzymatiques se font dans le respect des principes de la chimie verte, et permettent d'obtenir une grande quantité d'OS [32]. En revanche, leurs mises en application peut présenter des difficultés. Certaines enzymes peuvent être coûteuses à produire, et présentent des limites par rapport à leur rapidité d'hydrolyse, leur stabilité, ou les conditions de pH et de températures auxquelles elles sont les plus effectives [32]. En conséquence, l'utilisation d'enzymes pour des dépolymérisations (ou d'autres réactions) à l'échelle industrielle exige une optimisation poussée qui reste très coûteuse, limitant leur utilisation au profit de méthodes chimiques. Tous ces aspects poussent vers la recherche d'enzymes hydrolytiques moins coûteuses, hautement spécifiques, thermostables et avec des hauts niveaux d'activité [32].

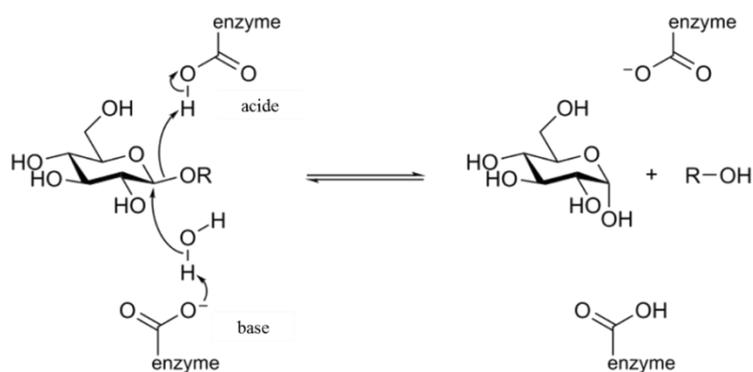
À notre connaissance, les enzymes de la famille des glycosides hydrolases (GH) sont les seules à être capables de dégrader les CARs et les fucoïdanes. Ces GH font typiquement intervenir une molécule d'eau dans un mécanisme acide/base guidé par deux rédis catalytiques pour hydrolyser la position en C1. Deux sous-classifications sont ensuite couramment utilisées. La première distingue les enzymes en fonction de leurs capacités à retenir ou à inverser la configuration du carbone anomérique (**Figures 13 et 14**). La seconde distingue les enzymes en fonction de leurs capacités à hydrolyser les sucres terminaux d'une chaîne (-exo) ou, au contraire, à libérer des OS en s'attaquant aux liaisons au sein des chaînes (-endo). De ce fait, pour la production des OS, seuls les enzymes -endo seront décrites.

Les enzymes capables d'hydrolyser les PS d'origine algale dont les  $\lambda$ -CARs et les fucodaines sont résumées dans la thèse de Maria Matard-Mann de 2017 [192].

A- Hydrolyse des  $\lambda$ -CARs par les  $\lambda$ -carraghénases

Les enzymes GH capables d'hydrolyser les CARs sont décrites par leurs spécificités de substrat [193]. C'est-à-dire que les  $\lambda$ -carraghénases (EC 3.2.1.162), les  $\kappa$ -carraghénases (EC 3.2.1.81) et les  $\iota$ -carraghénases (EC 3.2.1.157) dégradent uniquement les  $\lambda$ -CARs, les  $\kappa$ -CARs et les  $\iota$ -CARs, respectivement [193]. Ces endohydrolases, clivent la liaison glycosidique  $\beta$ -(1,4) pour produire des OS appartenant à la série dite « neocarrabiose » [193]. Leurs spécificités reposent sur la reconnaissance des motifs de sulfatation de la séquence répétitive disaccharidique des di-galactopyranoses (unités D et DA) [191].

Les  $\lambda$ -carraghénases sont une nouvelle famille des GH, qui n'a pas encore été classifiée jusqu'à maintenant dans le « carbohydre active enzymes (CAZy) » [191]. Les  $\lambda$ -carraghénases ont été décrites pour cliver de manière aléatoire par rapport aux  $\kappa$ - et  $\iota$ -carraghénases [191,194]. La bactérie marine *Pseudoalteromonas carrageenovora* est capable de synthétiser à la fois la  $\lambda$ -carraghénase et la  $\kappa$ -carraghénase. Guibet *et al.* 2007, ont démontré que la  $\lambda$ -carraghénase isolée de cette bactérie induisait une inversion de la configuration anomérique suite au clivage [194], comme chez les  $\iota$ -carraghénases [193] (**Figure 13**). Les principaux produits obtenus dans ces travaux après cette réaction enzymatique étaient principalement des neo- $\lambda$ -carratetraoses (DP4) et neo- $\lambda$ -carrahexaoses (DP6) [194]. Afin que le clivage soit possible, une longueur de chaîne de minimum quatre résidus de sucres avec des liaisons alternées de  $\alpha$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 est nécessaire [193].



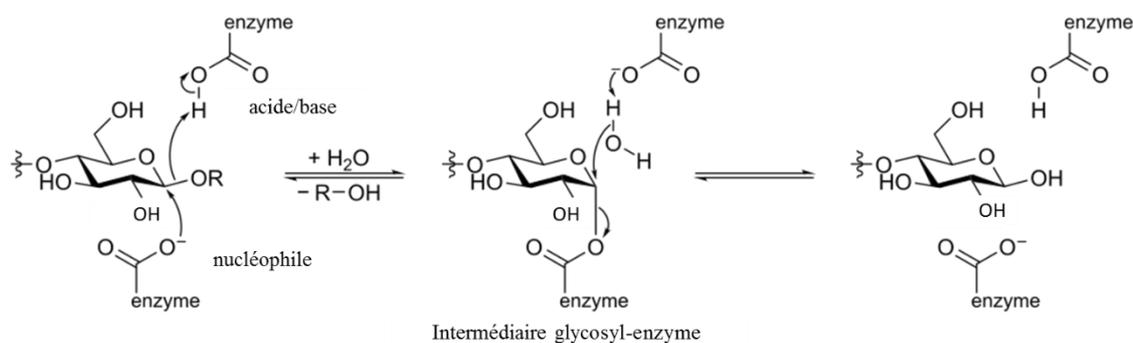
**Figure 13.** Mécanisme général de coupure des glycosides hydrolases par inversion [195].

Un autre exemple d'une bactérie produisant une  $\lambda$ -carraghénase est *Bacillus* sp, caractérisée par Jiang Li *et al.* 2014 [196]. L'avantage de cette enzyme est sa thermostabilité avec une température optimale de fonctionnement jusqu'à 75°C, contrairement à celle isolée de la bactérie *Pseudoalteromonas carrageenovora*, qui n'est active qu'à des températures

inférieures à 30°C [196]. Les produits principaux générés par l'enzyme dans cette étude étaient des  $\lambda$ -neo-carrabioses.

#### B- Hydrolyse des fucoïdanes par les fucoïdanases

Contrairement aux  $\lambda$ -CARs, il existe de nombreuses enzymes, identifiées chez les organismes marins (bactéries, algues, champignons, etc) capables de dégrader les fucoïdanes, appelées « Fucoïdanases » [197]. La classification de ces enzymes semble encore être compliquée en raison de la complexité structurale des fucoïdanes [197]. Selon la classification CAZy, les endo-fucoïdanases font partie des familles GH107 (EC 3.2.1.212) et GH168 (EC 3.2.1.211). Parmi les endo-fucoïdanases nouvellement identifiées, la Fhf1 et la Fhf2 de la famille GH107, isolées de la bactérie marine *Formosa haliotis*, sont des endo- $\alpha$ (1,4)-fucoïdanase capables de dégrader des fucoïdanes issus de différentes espèces d'algues brunes (*Fucus evanescens*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassum mcclurei*, et *Sargassum polycystum*) [198,199]. Également, la bactérie KMM 3553 isolée de l'algue brune *Fucus evanescens*, dégrade spécifiquement des fucoïdanes de classe 2 (composés d'une alternance de  $\alpha$ -1,3-L-fucopyranose et  $\alpha$ -1,4-L-fucopyranose et majoritairement sulfatés en position 2) [198,200]. D'autres enzymes sont dites, endo- $\alpha$ (1,3)-fucoïdanases, telle que l'enzyme Mf2 de la bactérie marine *Muricauda eckloniae* [201].



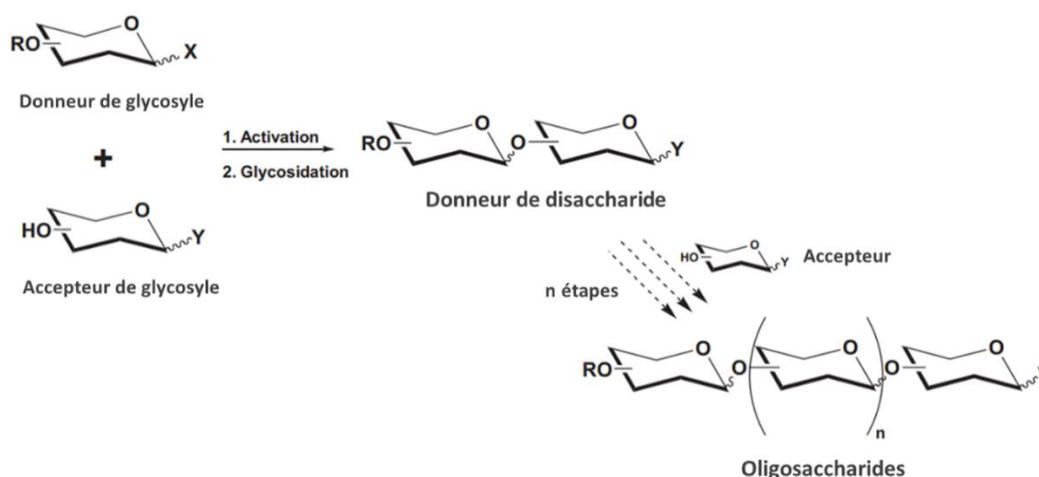
**Figure 14.** Mécanisme général de coupure des glycosides hydrolases par rétention [195].

Le mode d'action des fucoïdanases a très peu été étudié jusqu'à présent, bien que récemment, il a été démontré que le mode d'action des enzymes de la famille GH107 semblerait être similaire à celui des GH29 (exo  $\alpha$ -L-fucoïdanase), selon un mécanisme de rétention [197,202] (**Figure 14**).

### 2.5.2. Par synthèse totale

Mis à part la dépolymérisation des PS natifs, il est également possible d'obtenir des petits OS par synthèse totale à partir de simples monomères. En effet, grâce aux récents progrès dans les techniques de synthèse chimique et enzymatique, la préparation d'une large gamme d'oligomères est rendue possible [31]. L'obtention d'OS par ces méthodes est bien plus difficile par rapport à celle d'autres bio-polymères, tels que les peptides et les acides nucléiques. Cela est dû au nombre élevé de combinaisons possibles d'unités monomériques, et de leurs substitutions [31]. De plus, l'introduction stéréospécifique des liaisons glycosidiques se présente comme un véritable défi [31].

#### 2.5.2.1. Par synthèse chimique



**Figure 15.** Mécanisme général de la synthèse chimique d'oligosaccharides [31]. **R** : H ou saccharide.

Par synthèse chimique, le principe général de la réaction implique une condensation inter-glycosidique, entre un donneur et un accepteur de glycosyles (**Figure 15**) [31]. Néanmoins, elle est possible uniquement si l'étape d'assemblage du glycosyl (donneur et accepteur) possède un rendement élevé [31]. Par conséquent, la production d'OS chimiquement à l'échelle industrielle reste plus compliquée à élaborer, notamment lorsque la taille des OS dépasse l'ordre du pentasaccharide [31,33].

A l'échelle industrielle, l'**Arixtra** (fondaparinux), un médicament anticoagulant approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA), est un pentasaccharide synthétique

(similaire à l'héparine de BPM) [33]. Cependant, la production de celui-ci nécessite jusqu'à 60 étapes chimiques pour obtenir un rendement de 0,1% seulement. De plus, pendant les réactions chimiques, plusieurs étapes sont nécessaires pour éliminer les isomères incorrects et les sous-produits [33].

Par ailleurs, plusieurs études ont également montré la possibilité de synthétiser chimiquement des OS d'origine algale. Par exemple, la première synthèse chimique d'oligomères de fucoïdanes a eu lieu en 2004 par Gerbst et son équipe qui ont réussi à produire un trisaccharide de fucoïdane de type 1 [203]. Par la suite, grâce à cette même équipe ainsi que d'autres, des oligomères de type 2 ont été synthétisés, ou encore des oligomères avec des motifs de sulfatation différents par rapport au précurseur de départ [203].

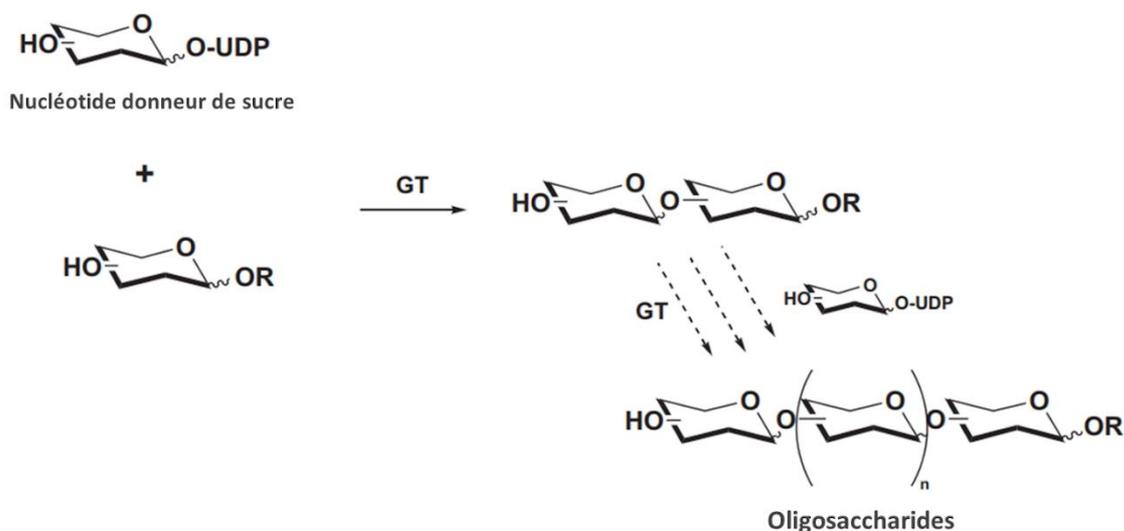
La synthèse d'OS de type  $\lambda$ - ne semble pas avoir été réalisée à ce jour, tandis qu'en 2019, Kinnaert et Clausen ont pu synthétiser un tétrasaccharide de  $\gamma$ -CAR à partir d'un pentaacétate de galactose commercial [204]. La synthèse de différents types d'OS de galactanes a également pu être réalisée par la voie chimique [31,205].

D'autres types d'OS d'origine algale synthétiques ou semi-synthétiques seront présentés dans le paragraphe «**4.4 de cette étude bibliographique**».

Bien qu'il persiste de nombreux défis, l'ensemble de ces efforts fournis reste très prometteur quant à la possibilité d'une synthèse de  $\lambda$ -COs et de F-Os purs par voie chimique. Si ce champ de recherche arrive à maturité, il représentera une grande avancée pour la réalisation d'études structure-fonction beaucoup plus précises, et, à terme, la translation des OS algaux vers la clinique.

#### 2.5.2.2. Par synthèse enzymatique

Comme pour la synthèse chimique, la synthèse enzymatique d'OS a également atteint l'échelle industrielle [31]. Elle implique l'utilisation de glycosyltransférases et de glycosylhydrolases permettant d'éviter les inconvénients des méthodes chimiques, grâce à une maîtrise à la fois de la régio- et de la stéréo- sélectivité de la glycosylation, durant des réactions douces, généralement entre 20-37 °C [31,33].



**Figure 16.** Mécanisme général de la synthèse enzymatique d'oligosaccharides par des glycosyltransférases (GT). **R:** H ou saccharides [31].

Les glycosyltransférases (E.C. 2.4.xy) catalysent le transfert de motifs saccharidiques à partir des molécules donneuses activées, vers des molécules acceptatrices spécifiques afin de former les liaisons glycosidiques (**Figure 16**) [31]. Les glycosylhydrolases (E.C. 3.2.1.-) sont également utilisées, en étant plus facilement disponibles que les glycosyltransférases, mais offrent généralement moins de stéréosélectivité [31]. De nombreux OS bioactifs sont produits par l'ingénierie enzymatique, tels que des OS de galactose à partir du lactose en utilisant la bêta-galactosidase [31]. Zhang *et al.* 2017, ont utilisé la synthèse chemo-enzymatique pour produire des OS d'héparine en combinant des étapes chimiques et enzymatiques [33].

À notre connaissance, il n'existe pas encore d'études concernant la synthèse d'OS de CARs et de fucoïdanes par la voie enzymatique.

## 2.6. Les méthodes de purification des λ-COs et des F-Os

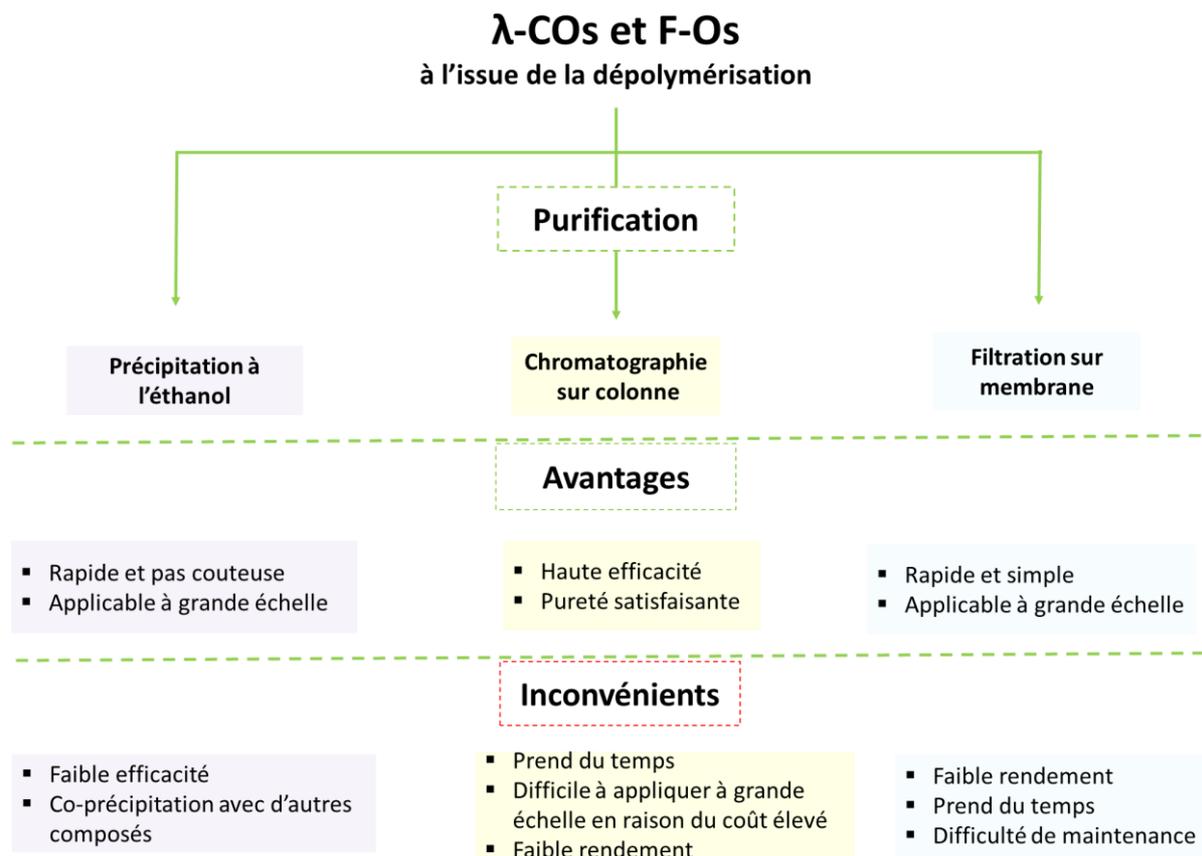
Pour les applications pharmaceutiques, les produits utilisés (principes actifs ou excipients) doivent répondre à des normes de qualité très strictes. Cela se manifeste notamment par des exigences en matière de pureté et d'homogénéité de ces produits, constituant ainsi l'un des principaux défis pour les produits biosourcés en général, et des PS en particulier.

Les PS d'origine naturelle utilisés pour ces applications à haute valeur ajoutée, subissent très souvent des purifications poussées à l'issue de leur extraction (voir **2.3.3** de cette **étude bibliographique**). Ces méthodes sont pratiquement identiques à celles appliquées pour la purification de leurs OS dérivants.

À l'issue de la dépolymérisation des PS, les formulations d'OS sont des mélanges d'espèces avec une certaine variabilité dans leurs paramètres de base (PM, DS) et leurs structures, ainsi que la présence d'impuretés ou de sous-produits de dégradation. Pour rappel, ce degré d'hétérogénéité va dépendre de :

- L'hétérogénéité liée aux espèces présentes dans la solution du PS natif qui va dépendre de la structure du PS lui-même, influencée par la variabilité environnementale mais aussi par les méthodes d'extraction et de raffinage utilisées.
- Des réactifs utilisés pour la dépolymérisation, tels que les acides, bases, résidus de protéines) ou additifs comme le tampon du pH ou les sels, qui se retrouvent dans le mélange s'ils ne sont pas éliminés.
- Du type et des conditions de la dépolymérisation qui, en fonction de la méthode utilisée, va générer un certain degré de variabilité parmi les OS générés en termes de PM, DS ou être à l'origine de produits secondaires de dégradation.

Afin de répondre à ces problématiques, le recours à des étapes de purification est donc souvent indispensable pour la production d'OS avec un haut degré de pureté, compatible avec les exigences de la pharmaceutique. Dans ce cadre, plusieurs méthodes « classiques » sont déjà réalisées à l'échelle industrielle, que ce soit sur les PS ou sur les OS (précipitation à l'éthanol, ultrafiltration, filtration sur membrane, dialyse, etc) [28,29,32,206]. D'autres méthodes, plus innovantes et déjà utilisées à l'échelle du laboratoire pour des caractérisations analytiques, sont en cours de transfert pour des applications de purification de lots à grande échelle. Elles sont principalement basées sur des techniques chromatographiques (exclusion stérique, séparation ionique, affinité) et électrophorétiques [28,29,32,207].



**Figure 17.** Schéma récapitulatif des principales techniques appliquées à la purification des  $\lambda$ -COs et des F-Os, avec leurs avantages et inconvénients [29].

Pendant les travaux de ce doctorat, les techniques mentionnées ci-dessus n'ont servi qu'aux caractérisations analytiques (exemple : SEC-HPLC, voir **3.1** de la **Partie 2 : Matériels et méthodes**), mais nous ne les avons pas abordés pour la purification des OS. Pour cet état de l'art, nous proposons donc un résumé succinct des principales techniques de purification accompagné de leurs avantages et inconvénients (**Figure 17**), ainsi que d'un tableau décrivant quelques exemples de méthodes appliquées à la purification de  $\lambda$ -COs et de F-Os (**Tableau 4**). Dans le cas où une méthode n'a pas été appliquée à la purification de  $\lambda$ -COs, des exemples d'autres types de CARs seront donnés.

**Tableau 4.** Exemples de méthodes appliquées à la purification de COs et de F-Os.

Purification	Support de séparation	Produit	Références
Précipitation et filtration sur membrane	À l'éthanol + dialyse	Hybride $\kappa$ -/l- : 2,4 kDa	[208]
		F-Os : 8-25 kDa	[158]
	Ultrafiltration	F-Os : 2,5-10 kDa	[209]
	Dialyse	$\lambda$ -CO : 27,2 kDa	[111]
Chromatographie d'exclusion stérique	Bio-gel P-6	k-COs, 3 fractions : DP2, DP 4 et DP6	[210]
	Bio-gel P4 et P2	F-Os, 2 fractions: DP 2, DP 3	[54]
	Superdex 30	$\lambda$ -COs: DP2-8	[194]
Chromatographie échangeuse d'anions	SAX-HPLC (POROS HQ50)	k-COs : DP5, DP7 et DP11	[211]
	Q-Sepharose	F-Os: DP4	[132]
HILIC	Colonne « Click » Maltose	$\mu$ et $\nu$ -COs, 18 fractions: DP2-7	[212]
Chromatographie par affinité pour colorant	Bleu de toluidine immobilisé sur des Sepabilles	F-Os, 3 fractions : 26 kDa, 39 kDa et 54 kDa	[129,136]

### 3. Les $\lambda$ -COs et F-Os thérapeutiques en oncologie (hors cible HPSE)

Les études réalisées dans le cadre de l'évaluation des activités anti-cancéreuses des  $\lambda$ -COs et des F-Os seront présentées, sans inclure celles impliquant leurs effets sur l'HPSE. Etant donné que les  $\lambda$ -COs et les F-Os sont au cœur de notre étude, nous avons tenu à présenter ces travaux d'une manière détaillée selon un ordre chronologique croissant. En ce qui concerne les  $\lambda$ -COs à fonction anti-cancéreuse, toutes les études seront présentées. Dans le cas des F-Os, les études les plus pertinentes (notamment les études de structure-fonction) seront présentées en raison du grand nombre de travaux réalisés.

Les **Tableau 5** et **Tableau 6** sont des récapitulatifs des études portant sur les  $\lambda$ -COs et les F-Os dans le cancer (hors cible HPSE).

#### 3.1. Activités anti-cancéreuses des $\lambda$ -COs

La première étude réalisée sur les  $\lambda$ -COs dans le cancer est celle de Zhou *et al.* 2004 [47]. Après l'extraction du  $\lambda$ -CAR natif de l'espèce d'algue rouge *Chondrus ocellatus*, suivi d'un fractionnement au KCl, un criblage a été réalisé sur des  $\lambda$ -COs obtenus par une dépolymérisation hydrothermale assistée par microondes. Les différentes formulations de  $\lambda$ -COs obtenues ont été testées *in vivo* sur des modèles de souris transplantées avec des tumeurs murines de sarcome S180 ou de carcinome hépatique H22. Toutes les formulations obtenues incluant le  $\lambda$ -CAR natif ont induit une inhibition significative de la progression tumorale, accompagnée d'effets immunomodulateurs (augmentation de la taille de la rate, de l'activité des lymphocytes et des cellules NK). Les résultats montrent toutefois des variations dans les effets qui sont contexte et structure dépendants. La formulation de 15 kDa (DS= 27,8 %) et celle de 9,3 kDa (DS= 21,8 %) de  $\lambda$ -COs se sont démarquées des autres avec des efficacités prometteuses à 200 mg/kg sur les tumeurs H22 et S180, respectivement. Les analyses structurales (FT-IR) réalisées dans cette étude ont confirmé la préservation de la structure de base, ainsi qu'une désulfatation limitée des  $\lambda$ -COs après la dépolymérisation du  $\lambda$ -CAR natif (à condition que le stress des microondes appliquées ne soit pas  $\geq 20$  atm). L'effet sur des tissus normaux n'a pas été établi. **Il s'agit également de la première étude ayant réalisé un criblage de  $\lambda$ -COs dans le cancer.**

La même équipe précédente de Zhou *et al.* a poursuivi les études en 2005 puis en 2006 en démontrant l'avantage d'utiliser les  $\lambda$ -COs comme adjuvants à la chimiothérapie à base de

---

5-fluorouracile (5-Fu) [213,214]. Les formulations de 9,3 et 15 kDa ont montré des effets anti-tumoraux par immunomodulation, respectivement sur les tumeurs murines S180 et H22. Pendant 7 jours, des doses de 100 mg/kg/J du  $\lambda$ -CO (9,3 kDa) ont été combinées à des doses de 25 mg/kg/J de 5-Fu (par voie orale). Cela a résulté en un taux d'inhibition de la tumeur du sarcome S180 de 63,87 % par rapport à 37,30 % avec un traitement au 5-Fu seul. Cette combinaison a également permis d'augmenter la taille de la rate, qui a tendance à diminuer avec un traitement au 5-Fu seul. Également, le traitement combiné a permis de restaurer la prolifération des lymphocytes qui était réduite par le 5-Fu seul et d'augmenter les niveaux du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ), une cytokine pro-inflammatoire et anti-tumorale sécrétée par des macrophages activées [215]. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant le  $\lambda$ -CO de 15 kDa sur les tumeurs murines hépatiques H22 [214]. Ces études confirment donc l'effet bénéfique que pourrait avoir les  $\lambda$ -COs comme traitements adjuvants aux chimiothérapies, en augmentant leur activité anti-tumorale et en améliorant l'immunocompétence qui est altérée par la chimiothérapie seule. **Ces études ont donc permis d'étudier les  $\lambda$ -COs dans deux modèles de cancers différents, et de générer des données *in vivo*. De plus, le fait que la meilleure efficacité envers un modèle soit obtenue avec un  $\lambda$ -CO d'un  $M_n$  et d'un DS donné, fait preuve d'une relation structure-fonction.**

Une autre étude réalisée par Chen *et al.* 2007, a également montré un potentiel anticancéreux très prometteurs sur deux modèles différents, avec un  $\lambda$ -CO (3,35 kDa) obtenu par une hydrolyse acide supportée utilisant une résine cationique (provenance du  $\lambda$ -CAR natif non indiquée) [168]. Ils ont montré d'une part, sur le modèle de la membrane choriollantoïde d'embryon de poulet (CAM assay), une inhibition à plus de 50% de la formation des vaisseaux par une concentration de 100 et 200  $\mu$ g/œuf après 48h de traitement au  $\lambda$ -CO. D'autre part, l'impact du  $\lambda$ -CO a été évalué sur les cellules endothéliales humaines HuVECs, impliquées dans les processus d'angiogenèse. La survie (mesurée par test MTT) de ces cellules a été inhibée de manière dose dépendante (0,125-1 mg/mL) après 24 et 48h de traitement. À 1mg/mL pendant 48h, une inhibition de 60,23% de la survie a été observée sur les cellules HuVECs, alors que sur des cellules humaines du cancer hépatique Bel-7402 et sur des hépatocytes normaux humains L-02, cette inhibition est restée très minime (< 20%). Cela a été expliqué d'une manière un peu précipitée, par le fait que lorsqu'une haute dose de  $\lambda$ -CO arrive dans un tissu tumoral, elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales en premier lieu, avant d'attaquer les cellules tumorales et normales, ce qui permet d'inhiber l'angiogenèse de manière

efficace. **Il faut aussi noter la dose de 1 mg/mL utilisée qui reste élevée.** Par la suite, de manière plus classique, l'étude montre que la formation des tubes capillaires par les cellules HuVECs a été inhibée à une dose non toxique de 200 µg/mL de λ-CO après 24h. L'invasion et la migration des cellules HuVECs ont également été significativement inhibées à 200 µg/mL après un traitement de 24 et 48h, respectivement. Ces effets ont été expliqués par l'inhibition de l'expression des MMP-2 (76,02%) mesurée à 120 µg/mL après 24h de traitement. Il est néanmoins regrettable que les expériences d'invasion et de migration n'aient pas été étendues sur un modèle de cellules cancéreuses. **Le λ-CAR natif n'a pas été utilisé comme contrôle dans cette étude. Il faut également noter qu'aucune caractérisation structurale, ni d'estimation du DS, n'ont été effectués sur les λ-COs.**

En 2009, la même équipe précédente de Chen *et al.* a approfondi ses études pour explorer la mécanistique de l'effet anti-cancéreux du même λ-CO sur les HuVECs [216]. Le stress oxydatif est l'un des éléments responsables de la mort cellulaire, poussant cette équipe à étudier en premier l'effet du λ-CO sur les niveaux des espèces réactives d'oxygène. Après 24h de traitement à des concentrations de 0,8 et 1 mg/mL, les niveaux de fluorescence intracellulaires des espèces réactives d'oxygène étaient 11,4 et 13,2 fois plus élevés par rapport au contrôle, respectivement. De plus, l'apoptose précoce a été induite de manière dose dépendante, avec 41,11 % de cellules apoptotiques après 24h de traitement à 1 mg/mL. Cette apoptose a été expliquée par l'augmentation des niveaux des protéines pro-apoptotiques (P53, Bax, caspases- 9 et 3) et par une diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Cela a également été accompagné d'un arrêt du cycle cellulaire en phases S et G2/M. Ces résultats suggèrent que l'exposition à de hautes concentrations du λ-CO active la voie apoptotique mitochondriale ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire à travers la génération des espèces réactives d'oxygène. Ces résultats sont similaires avec ceux de Mi *et al.* 2008, sur lesquels uniquement le résumé de l'article est accessible [217].

Calvo *et al.* 2019 ont comparé les effets anti-prolifératifs de plusieurs types de CAR natifs et de leurs dérivés dépolymérisés [111]. Dans cette étude, les effets anti-prolifératifs (mesurés par MTT) sur les cellules LM2 dérivées d'un adénocarcinome murin étaient beaucoup plus significatifs avec un traitement par les κ- et ι- CARs natifs par rapport à un traitement par le λ-CAR natif. Ces résultats ont été expliqués par le fait qu'un DS élevé n'était pas très avantageux pour une activité cytotoxique. L'étude s'est poursuivie par la comparaison de

l'activité cytotoxique d'un  $\lambda$ -CO de DP= 43,2 et de deux  $\kappa$ -COs de DP 25,5 et 6,5 ; obtenus par des hydrolyses acides après une purification par dialyse. Les  $IC_{50}$  de leurs activités cytotoxiques sur les cellules LM2 ont été estimées à  $0,95\pm 0,11$  mg/mL;  $0,39\pm 0,05$  mg/mL et à  $0,38\pm 0,04$  mg/mL, respectivement. Dans cet article, ils ont conclu que la dépolymérisation a permis d'améliorer les effets cytotoxiques, or, en se basant sur les résultats donnés, **il est possible de noter une contradiction quant au cas du  $\kappa$ -CAR natif ( $IC_{50}$  estimée à  $0,23\pm 0,02$  mg/mL), et des  $\kappa$ -COs. Néanmoins, dans tous les cas, la toxicité des  $\kappa$ -COs reste supérieure à celle du  $\lambda$ -CO, (qui a un DP plus élevé), mettant en avant l'effet sucre-dépendant vis-à-vis d'un même type cellulaire. Dans cette étude, l'effet anti-prolifératif des candidats n'a pas été testé sur des cellules normales. Enfin, malgré les caractérisations structurales poussées (RMN), le DS n'a pas été estimé pour l'ensemble des OS générés.**

Cicinskas *et al.* 2020 ont étudié l'activité immunomodulatrice et anti-tumorale des  $\kappa$ - et  $\lambda$ - CARs (174,5 et 260-300 kDa, respectivement) natifs extraits de l'espèce d'algue rouge *Chondrus armatus* et raffinés par un fractionnement au KCl, ainsi que leurs COs (0,7–20 et 10–170 kDa pour le  $\kappa$ - et  $\lambda$ - CO, respectivement) [112]. Ces derniers ont été obtenus par une hydrolyse acide à l'HCl pour les  $\kappa$ - et par hydrolyse hydrothermale pour les  $\lambda$ - (suivies de dialyses). Il est possible de remarquer une large dispersion dans les PM, notamment dans celui du  $\lambda$ -CO, indiquant la résistance du  $\lambda$ -CAR natif au type d'hydrolyse appliquée. Globalement, de manière dose dépendante (0-0,1  $\mu$ g/ml), tous les candidats testés ont induit une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$ , IL6, IL18, et TNF $\alpha$ ) par les monocytes humains, avec la meilleure efficacité obtenue par le biais du  $\lambda$ -CO. De plus, ce dernier était le seul à pouvoir induire la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL10. Les auteurs n'ont toutefois pas replacé ses effets d'immunomodulation dans un contexte oncologique. Par ailleurs, de manière pratiquement dose dépendante également, tous les échantillons testés ont montré un effet anti-métabolique (mesuré par MTT) sur deux lignées d'adénocarcinome de l'œsophage humain, avec un meilleur effet sur les cellules FLO1 en présence du  $\kappa$ -CO et du  $\lambda$ -CO (après 24h à 400  $\mu$ g/mL), contrairement aux cellules KYSE-30, dans lesquelles les CARs natifs étaient plutôt plus efficaces que leurs COs respectifs (dans les mêmes conditions de traitement). Les différents candidats testés n'avaient pas d'effets sur la mort cellulaire (calculée par un marquage des noyaux), suggérant que leurs actions se restreignaient au métabolisme cellulaire qui induisait un arrêt du cycle cellulaire. Pris ensemble, ces résultats soutiennent l'idée que les CARs, notamment de BPM, sont des composés naturels immunologiquement actifs

---

prometteurs doublés d'une activité anticancéreuse. Également, sur des cellules normales de type leucocytes humaines et fibroblastes, aucun effet significatif n'a été observé. Ces résultats montrent encore que l'effet biologique dépend de la structure moléculaire, du PM, du type cellulaire, et de la dose de traitement. **Des caractérisations structurales de type composition monosaccharidique, et FT-IR ont été réalisées. Néanmoins, le DS n'a pas été estimé.**

L'activité anti-proliférative et pro-apoptotique de  $\kappa$ -COs (0,9 kDa) et de  $\lambda$ -COs (21,9 kDa) a été évaluée *in vitro* sur des modèles de cancers gastro-intestinaux (KYSE-30, FLO-1, HCT-116 et RKO) par Tiasco *et al.* 2022 [113]. Les PS natifs extraits de l'algue rouge *Chondrus armatus* (suivi d'un fractionnement au KCl) ont subi une sonication pour produire les OS (purifiés par dialyse). Les résultats ont montré un effet cytotoxique (mesuré par MTT) sur toutes les lignées cellulaires avec des IC<sub>50</sub> comprises entre 184-405  $\mu\text{g/mL}$ . De manière intéressante, les effets sur le cycle cellulaire sont distincts en fonction du type de COs et du type de cellules cancéreuses. Par exemple, dans les cellules KYSE-30, le traitement avec le  $\kappa$ -CO (IC<sub>50</sub>= 394  $\mu\text{g/mL}$ ) a induit à un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M, alors que le  $\lambda$ -CO (IC<sub>50</sub>= 352  $\mu\text{g/mL}$ ) a induit un blocage en phase G1. Plus en détail, les deux OS ont induit une diminution des niveaux protéiques de plusieurs marqueurs impliqués dans le cycle cellulaire (CDK2, E2F2). Concernant l'apoptose, les effets peuvent varier en fonction du type de CO. En effet, les deux OS ont induit l'apoptose sur les adénocarcinomes, en particulier sur les cellules humaines du carcinome colique RKO, où le  $\lambda$ -CO (248,3  $\mu\text{g/mL}$ ) a induit une apoptose tardive, et le  $\kappa$ -CO (350,6  $\mu\text{g/mL}$ ) une apoptose précoce. Aucun effet significatif n'a été observé sur la lignée humaine épithéliale saine (RPE-1). **Dans cette étude les CARs natifs n'ont pas été inclus dans les contrôles. La structure des COs obtenus a été caractérisée par RMN et FT-IR. Le DS n'a pas été estimé.**

Les derniers travaux de l'activité anti-cancéreuse (hors cible HPSE) des  $\lambda$ -COs se clôturent avec l'étude de Tang *et al.* 2023, dans le cadre du carcinome gastrique humain BGC-823 [163]. **C'est la deuxième étude utilisant le  $\lambda$ -CO en combinaison avec un traitement chimiothérapeutique.** Dans cette étude, un  $\lambda$ -CO de 1,8 kDa et d'un DS de 38,15 % a été préparé par une hydrolyse acide (HCl) à partir du  $\lambda$ -CAR natif commercial. La solution de  $\lambda$ -CO a été purifiée par ultrafiltration (cut-off de 5 kDa). Les résultats ont montré que la viabilité (mesurée par un test d'absorbance CCK-8 assay) des cellules BGC-823, n'était impactée par le  $\lambda$ -CO (de manière dose dépendante) qu'en présence d'un milieu de culture conditionné par des

cellules mononucléées de la leucémie myéloïde humaine THP-1. La plus haute inhibition de la viabilité cellulaire (20,5 %), et le plus haut effet pro-apoptotique ont été obtenus après 24h de traitement à une concentration de 20 µg/mL avec le λ-CO. Néanmoins, ces effets restent inférieurs à ceux du traitement avec le 5-Fu, une chimiothérapie de référence dans le traitement du cancer gastrique. De manière intéressante, dans ces mêmes conditions, les niveaux protéiques des cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF-α et l'interféron gamma (IFN-γ) ont été significativement augmentés par le λ-CO en présence du milieu conditionné, contrairement au 5-Fu, qui a plutôt diminué la sécrétion de ces cytokines. Par ailleurs, *in vivo* sur un modèle de souris BALB/c injectées par les cellules BGC-823, le λ-CO a induit une diminution de la progression tumorale en fonction du temps, et cela de manière dose dépendante (76,9 % à 200 mg/kg après 21 jours). Le taux d'inhibition a été augmenté de 21,2 % en combinant le traitement du λ-CO à celui du 5-Fu. Également, les résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par une augmentation des niveaux protéiques des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IFN-γ) et des protéines pro-apoptotiques (forme clivée de la caspase-8). **Le λ-CAR natif n'a pas été inclus comme contrôle. Également, celui-ci n'a pas été fractionné au KCl afin d'éliminer la présence du type κ-. Les résultats sont cohérents avec ceux des travaux de Zhou *et al.* 2005, 2006, démontrant que le λ-CO peut améliorer l'effet anti-tumoral du 5-Fu tout en évitant l'immunosuppression induite par celui-ci [213,214]. Enfin, des analyses structurales en MS ont été réalisés.**

**Tableau 5.** Récapitulatif des études portant sur les λ-COs dans le cancer (**hors cible HPSE**).

PM (kDa)	DS (%)	Type de cancer	Effet observé	Dose	Référence
9,3	21,8	Tumeur murine de sarcome S180 ( <i>in vivo</i> )	Inhibition de la progression tumorale par immunostimulation	200 mg/kg	[47]
15	27,8	Carcinome hépatique H22 ( <i>in vivo</i> )			
9,3	21,8	Tumeur murine de sarcome S180 ( <i>in vivo</i> )		100 mg/kg de λ-CO combinés à 25 mg/kg de 5-FU	[213]
15	27,8	Carcinome hépatique H22 ( <i>in vivo</i> )			[214]
3,35	-	Cellules endothéliales humaines HUVECs	Inhibition de la viabilité	1 mg/mL	[168]

		<i>(in cellulo)</i>	Anti-angiogénique, anti-migratoire et anti-invasif	200 µg/mL	
3,35	-	HUVECs <i>(in cellulo)</i>	Pro-apoptotique, arrêt du cycle cellulaire	1 mg/mL	[216]
6,9	-	Adénocarcinome murin : cellules LM2 <i>(in cellulo)</i>	Cytotoxique non significatif	IC <sub>50</sub> =0,95 mg/mL	[111]
10-170	-	Adénocarcinome de l'oesophage humain : cellules FLO1 <i>(in cellulo)</i>	Immunostimulation, inhibition de la viabilité	400 µg/mL	[112]
21,9	-	Gastro-intestinale : cellules KYSE-30 <i>(in cellulo)</i>	Arrêt du cycle cellulaire	352 µg/mL	[113]
		Gastro-intestinal: cellules RKO <i>(in cellulo)</i>	Pro-apoptotique	248,3 µg/mL	
1,8	38,15	Gastrique : cellules BGC-823 <i>(in cellulo)</i>	Pro-apoptotique, inhibition de la progression tumorale, immunostimulation	20 µg/mL <i>in vitro</i>	[163]
		Souris injectées avec les cellules BGC-823 <i>(in vivo)</i>		200 mg/kg λ-CO + 20 mg/kg 5-Fu <i>(in vivo)</i>	

Cette étude bibliographique sur les  $\lambda$ -COs dans le cancer (**hors cible HPSE**) indique que :

- Les seuls cancers humains étudiés jusqu'à présent sont de type gastrique.
- Quatre études uniquement ont été réalisées *in vivo*.
- Trois études combinent les  $\lambda$ -COs à des traitements chimio-thérapeutiques.
- Aucune étude clinique n'a été réalisée sur les  $\lambda$ -COs.
- Les  $\lambda$ -COs ne sont pas cytotoxiques sur des cellules normales.
- Les effets anti-tumoraux sont sucre-dépendants et type cellulaire-dépendants.
- Globalement, les effets observés sont anti-prolifératifs à travers une induction de l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire *in vitro*. *In vivo*, il y a une diminution de la progression tumorale (baisse du poids de la tumeur). Ces effets peuvent également être accompagnés d'une immunostimulation.
- Aucune étude n'a été réalisée sur l'effet anti-invasif, anti-migratoire, anti-angiogénique et anti-métastatique, de  $\lambda$ -COs sur cellules cancéreuses.
- Aucune étude n'a été portée sur le  $\lambda$ -CO dans le cadre de cancers liquides.
- Confusion dans l'utilisation des termes « cytotoxicité » et « anti-métabolique ».
- Uniquement une seule étude a réalisé un criblage de différents  $\lambda$ -COs.
- Après la dépolymérisation, les  $\lambda$ -COs ne sont pas toujours purifiés.
- Les caractérisations structurales de types FT-IR et RMN ne sont pas toujours réalisées.
- Plusieurs études n'ont pas estimé le DS.
- En général un fractionnement au KCl est réalisé afin de séparer le  $\lambda$ -CAR du  $\kappa$ -CAR.
- Les espèces d'algues rouges *Chondrus ocellatus* et *Chondrus armatus* sont très utilisées.

### 3.2. Activités anti-cancéreuses des F-Os

Contrairement aux  $\lambda$ -COs, les études sur les F-Os dans le cancer (hors cible HPSE) sont très nombreuses, avec des mécanismes d'action moléculaire mieux élucidés. Cela est certainement dû au fait que plusieurs espèces d'algues brunes produisent du fucoïdane, contrairement au  $\lambda$ -CAR qui est principalement synthétisé par l'espèce d'algue rouge *Chondrus crispus*. Plusieurs excellentes revues ont résumé les études portées sur les F-Os dans le cancer [36,108,218–220]. Dans cette partie, nous prêterons beaucoup plus d'attention aux études de

---

structure-fonction, et aux études cliniques réalisées sur les F-Os dans le cancer (hors cible HPSE).

En 2011, Cho *et al.* ont étudié la relation entre la sur-sulfatation et l'activité anti-cancéreuse *in vitro* de différentes fractions de fucoïdane [55]. Après l'extraction du fucoïdane natif de l'espèce *Undaria pinnatifida*, une hydrolyse par l' $H_2O_2$  a été appliquée, suivie d'un fractionnement par ultrafiltration (cut-off de 30 ou de 5 kDa), afin de produire des fractions à  $30 \text{ kDa} < M_w < 5 \text{ kDa}$  ( $F_{5-30k}$ ), et  $> 30 \text{ kDa}$  ( $F_{>30k}$ ). Ensuite, sur ces dernières, une sur-sulfatation a été appliquée ou non. L'activité anti-cancéreuse (mesurée par un test colorimétrique de la densité cellulaire) a ensuite été évaluée sur la lignée cellulaire humaine du cancer de l'estomac AGS. Les résultats ont montré qu'entre 0,2 et 0,8 mg/mL, les fractions  $F_{5-30k}$ , avaient une activité anti-cancéreuse dose-dépendante (19,2%-57,5%), contrairement aux fractions  $F_{>30k}$  qui ont présenté une plus faible activité dose-dépendante (18,0 %-28,5%). En revanche, lorsque ces fractions étaient sur-sulfatées, l'activité anti-cancéreuse avait significativement augmenté. **Dans cette étude, ces effets n'ont pas été comparé à ceux du fucoïdane natif. De la caractérisation structurale en FT-IR a été réalisée.**

En 2013, Zhang *et al.* ont étudié l'effet anti-cancéreux d'un F-O préparé ( $M_w = < 0,5 \text{ kDa}$ , DS= 14,5 %) par une digestion enzymatique, à partir d'un fucoïdane natif extrait de l'espèce *Cladosiphon navae-caledoniae*. [221] L'exposition des cellules MDA-MB-231 à ce F-O a induit une baisse de la viabilité (mesurée par MTT) de manière dose dépendant, et une apoptose (à 820  $\mu\text{g/mL}$ ) associée à l'activation des caspases et à un dysfonctionnement mitochondrial. **Les effets n'ont pas été comparés à ceux du fucoïdane natif, et les cellules normales n'ont pas été testées. Une caractérisation structurale de la composition monosaccharidique a été réalisée. En revanche, l'information sur une éventuelle purification du F-O n'a pas été donnée.**

En 2015, Chen *et al.* ont étudié l'activité anti-angiogénique et anti-tumorale d'un F-O d'un PM de 760 Da et d'un DS de 40,8 %, préparé par voie enzymatique à partir du fucoïdane natif extrait de l'espèce d'algue brune *Sargassum hemiphyllum*, et purifié par ultrafiltration (cut-off de 30 puis de 1 kDa) [222]. Dans un premier temps, ils ont démontré que de manière dose dépendante (0-100  $\mu\text{g/mL}$ ), ce candidat réduisait significativement la formation des tubes capillaires des cellules HuVECs induite par l'hypoxie et l'addition du « vascular endothelial growth factor » (VEGF). Dans la lignée cancéreuse humaine de la vessie T24 hypoxique, la

---

migration et l'invasion n'étaient que de 24,57 et 6,32 % par rapport au contrôle en présence de 100 µg/mL du F-O. Dans ces cellules, l'induction de l'hypoxie a été marquée par une augmentation des niveaux protéiques et de l'activité transcriptionnelle du facteur induit par l'hypoxie HIF1 $\alpha$ , du VEGF, et par l'augmentation de la production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces altérations induites par l'hypoxie ont dramatiquement été réduites par le F-O à 100 µg/mL. *In vivo*, dans des modèles de souris xénogreffes injectées par les cellules T24, le F-O a également significativement inhibé l'angiogenèse et la progression tumorale, de manière dose dépendante (80-300 mg/kg, pendant 30 jours). Aucune baisse du poids total des souris n'a été observée. Il a également été démontré que le candidat agissait à travers l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR induite par la fixation du VEGF à son récepteur (VEGFR) dans des conditions d'hypoxie. **Dans cette étude, le fucoïdane natif n'a pas été inclus dans les contrôles, et aucune caractérisation structurale poussée du F-O n'a été réalisée.**

Par ailleurs, les F-Os se démarquent par rapport aux autres OS d'origine algale par le fait qu'ils soient les seuls à avoir atteint le stade des études cliniques [36]. Par exemple en 2017, un F-O de 0,8 kDa avec un DS de 38,9 %, obtenu par une hydrolyse enzymatique à partir du fucoïdane natif (extrait de l'espèce d'algue brune *Sargassum hemiphyllum*) a été préparé pour un essai clinique [223]. Cet essai a été réalisé afin d'évaluer l'effet du F-O en tant qu'adjuvant chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Pour ce faire, deux groupes de patients ont été désignés, un recevant l'adjuvant F-O (28 patients, 4g deux fois jour), et un groupe contrôle (26 patients, 4 g de cellulose deux fois jour). Les deux groupes ont reçu un traitement chimiothérapeutique à base d'acide folinique, de 5 F-u, d'Irinotecan et de Bevacizumab, comme première ligne de traitement. Après 6 mois de traitement, le taux de contrôle de la maladie (la somme de la réponse complète, la réponse partielle et la stabilité de la maladie) était beaucoup plus significatif dans le groupe traité avec l'adjuvant F-O. En ce qui concerne la survie, les effets secondaires (des chimiothérapies) et la qualité de vie, les différences n'étaient pas significatives entre les deux groupes. **Le F-O a été produit par une entreprise disposant de la certification « bonnes pratiques de fabrication ».** D'autres exemples sur des études cliniques avec les F-Os dans le cancer sont reportées dans la revue de Turrini *et al.* 2023 [36].

En 2020, Gupta *et al.* ont réalisé une étude structure-fonction de l'effet de différents fucoïdanes sur un ostéosarcome humain (lignée MG63) [40]. Dans cette étude, le fucoïdane

---

natif commercial (de l'espèce *Fucus vesiculosus*, 20-200 kDa, DS= 33,92%), et celui extrait de l'espèce *Sargassum filipendula* (PM= mélange non fractionné, DS= 16,52%), ont été étudiés. Le fucoïdane de cette dernière a été purifié par dialyse puis fractionné (par ultracentrifugation) pour produire trois fractions différentes : 10-50 kDa (DS= 15,05 %), 50-100 kDa (DS= 25,99%), et > 100 kDa (DS= 20,13%). Les résultats ont montré que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'accumulation des cellules en phase sub-G1, ont été plus forts, suite aux traitements (100 µg/mL) avec les fucoïdanes ayant le plus haut DS. En revanche, la fragmentation mitochondriale n'a eu lieu qu'avec le fucoïdane natif de l'espèce *Fucus vesiculosus*. De plus, ce dernier a induit l'apoptose, contrairement au fucoïdane natif de l'espèce *Sargassum filipendula*, qui lui, a causé une nécrose. **Il faut noter que ces deux fucoïdanes natifs étaient différents en termes de PM, de DS et de composition monosaccharidique. Ainsi, cette étude met en valeur à la fois l'importance du DS et de la structure dans l'activité anti-cancéreuse des fucoïdanes.**

Dans une étude réalisée par Chen *et al.* 2022, il a été démontré que le traitement avec un F-O purifié de 1,2 kDa et d'un DS de 35,4 % (obtenu par une hydrolyse enzymatique à partir du PS natif extrait de l'espèce *Laminaria japonica*) induisait des effets cytotoxiques (apoptose, et arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M), un effet immunomodulateur (polarisation des macrophages), anti-migratoire et anti-métastatique, et cela en combinaison avec le traitement chimiothérapeutique l'Olaparib, dans le cadre du TNBC (*in vitro* dans les cellules MDA-MB-31 et *in vivo* dans des souris injectées avec les cellules 4T1) [224]. **Dans cet article, le fucoïdane natif n'a pas été inclus comme contrôle. La composition monosaccharidique a été déterminée.**

Récemment, en 2023, Luo *et al.* ont examiné les effets anti-prolifératifs et apoptotiques de deux fucoïdanes (F1 et F2) isolés et purifiés de l'espèce *Sargassum hemiphyllum*, avec leurs deux dérivés dépolymérisés (DF1 : 14,9 kDa ; DS 14,89 % et DF2 : 21,3 kDa ; DS 29,88 %) [225] par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> couplé à l'acide ascorbique, puis purifiées (sur une colonne de SEC). Les études ont été menées sur trois lignées modélisant différents cancers : un carcinome hépatocellulaire humain (HepG2), un carcinome utérin humain (Hela) et un cancer du poumon humain (A549). Les résultats ont montré que les quatre fractions (F1, F2 ; DF1, et DF2) ont réduit (à 0,5 à 8 mg/mL) l'activité métabolique (mesurée par MTT) des lignées Hela et A549, avec des effets plus forts sur les cellules HepG2. Le meilleur effet a été celui de DF2 avec une

IC<sub>50</sub> de 2,2 mg/mL, justifiant la corrélation entre les bioactivités des F-Os et leurs teneurs en sulfates et leurs PM. En revanche, sur les cellules hépatiques normales, les effets étaient très faibles. Par ailleurs, le plus haut pourcentage de cellules apoptotiques était dans les cellules HepG2, révélant un potentiel dans la thérapie anti-cancéreuse ciblant le foie. **Dans cet article les différents candidats ont été caractérisés par la détermination de la composition monosaccharidique et par FT-IR.**

**Tableau 6.** Quelques exemples d'études réalisées sur les F-Os dans le cancer (**hors cible HPSE**).

PM (kDa)	DS (%)	Type de cancer	Effet observé	Dose	Référence
5-30	56,8 (sur-sulfaté)	Cancer humain de l'estomac (lignée AGS) ( <i>in cellulo</i> )	Activité anti-cancéreuse (mesure de la densité cellulaire)	0,8 mg/mL	[55]
<0,5	14,5	TNBC (lignée MDA-MB-231) ( <i>in cellulo</i> )	Baisse de la viabilité cellulaire, effet pro-apoptotique	820 µg/mL	[221]
0,76	40,8	Cancer humain de la vessie (lignée T24) ( <i>in cellulo</i> et <i>in vivo</i> )	Effet anti-angiogénique et anti-tumorale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (sur des xénogreffes murins)	<i>In vitro</i> : 100 µg/mL <i>In vivo</i> : 300 mg/kg	[222]
0,8	38,9	Cancer colorectal métastatique ( <b>essai clinique</b> )	Augmentation du taux de contrôle de la maladie	4 g deux fois par jours pendant 6 mois en supplément avec des traitements chimiothérapeutiques	[223]
10-50	15,05	Ostéosarcome humain (lignée MG63) ( <i>in cellulo</i> )	Anti-métabolique	100 µg/mL	[40]
1,2	35,4	TNBC ( <i>in cellulo</i> MDA-MB-231, <i>in vivo</i> 4T1)	Anti-prolifératif, pro-apoptotique, immunomodulateur, anti-migratoire et anti-métastatique,	<i>In vitro</i> : 400 µg/mL <i>In vivo</i> : 150 mg/kg pendant 5 semaines	[224]

			en combinaison avec l'Olaparib		
21,3	29,88	Carcinome hépatocellulaire humain (HepG2), carcinome utérin humain (Hela), et cancer du poumon humain (A549) <i>(in cellulo)</i>	Effet anti-métabolique, pro-apoptotique (uniquement sur les HepG2)	0,5-8 mg/mL	[225]

Cette étude bibliographique sur les F-Os dans le cancer (**hors cible HPSE**) indique que :

- Les F-Os se démarquent des  $\lambda$ -COs par le fait qu'ils soient testés sur différents cancers humains dans plusieurs processus (migration, angiogenèse et métastases), et qu'ils aient atteint le stade clinique.
- La plupart des F-Os étudiés ne sont pas cytotoxiques sur des cellules normales.
- Les effets observés sont anti-prolifératifs accompagnés souvent d'une induction de l'apoptose *in cellulo*. *In vivo*, il y a une diminution de la progression tumorale.
- Des effets immunomodulateurs, anti-migratoires et anti-métastiques, ont été observés *in cellulo* et *in vivo*, avec des combinaisons à des chimiothérapies.
- Aucune étude n'a été portée sur les F-Os dans le cadre de cancers liquides (à part les travaux collaboratifs de notre équipe avec le laboratoire CRIBL (UM7276 INSERM 1262), qui seront présentés ultérieurement.
- Après la dépolymérisation, les F-Os ne sont pas toujours purifiés.
- Les caractérisations structurales de types FT-IR et RMN sont utilisées.
- Comme pour les natifs, les espèces les plus étudiées sont *Fucus vesiculosus*, *Sargassum sp*, *Undaria pinnatifida*.

## 4. L'inhibition de l'héparanase (HPSE), un phénotype d'intérêt à cibler

### 4.1. Généralités sur l'HPSE

L'HPSE est une protéine multifonctionnelle purifiée initialement du placenta humain et du mastocytome (tumeur maligne des mastocytes) murin [63]. Chez l'homme, son expression se limite à quelques tissus uniquement, dont le placenta, les organes lymphoïdes, les kératinocytes, les plaquettes et les cellules immunitaires [62,63,65]. En revanche, chez les rongeurs du genre *Spalax*, l'HPSE est répandue dans divers tissus incluant le foie, le cœur, le cerveau et les yeux [62,63,65].

Lors des conditions physiologiques, l'expression de l'HPSE est exclusivement régulée dans le cadre des processus vitaux tels que la régénération tissulaire, le développement embryonnaire, l'immunosurveillance ou encore la croissance capillaire [62,63,226]. Elle est préférentiellement surexprimée durant les conditions pathologiques telles que celles du cancer. Sa surexpression dans les cellules tumorales faiblement métastatiques chez les animaux de laboratoire, leur confère un phénotype hautement invasif [227].

La régulation positive de l'HPSE a été confirmée dans pratiquement toutes les tumeurs humaines primaires examinées [64]. Sa haute expression a initialement été prouvée dans les tumeurs solides d'origine épithéliale incluant les carcinomes du côlon, du foie, du pancréas, de la thyroïde, du col de l'utérus, de la vessie, de la prostate, du sein, ou encore de l'estomac [64]. Par la suite, cela a été également démontré dans le cas de tumeurs hématologiques, des sarcomes, et plus tard, dans les tumeurs du système nerveux central [64].

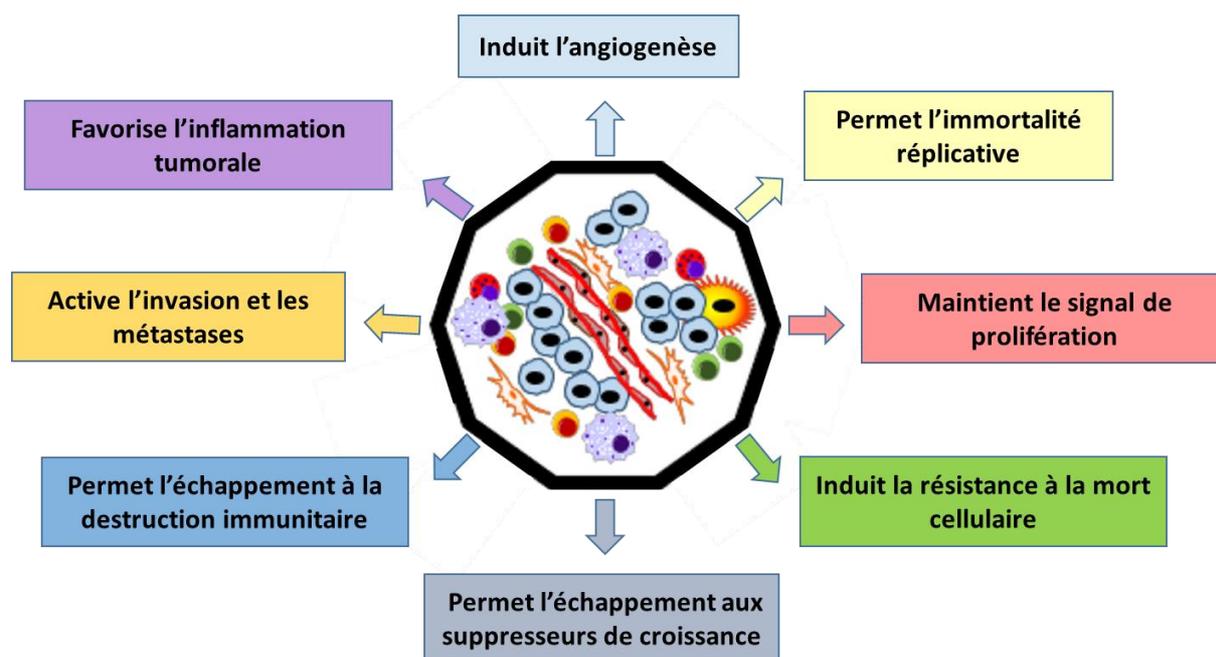
Des études cliniques ont montré que la détection de niveaux élevés de l'HPSE dans les tissus cancéreux, était associée à un mauvais pronostic par rapport à des patients présentant peu ou pas d'HPSE [228]. En effet, les patients diagnostiqués comme « HPSE positifs » présentaient un taux significativement plus élevé de métastases locales et distantes, ainsi qu'une survie postopératoire réduite, par rapport à des patients diagnostiqués comme « HPSE négatifs » [228]. De plus, spécialement dans les tumeurs solides, les analyses immunohistochimiques ont montré que les niveaux les plus élevés de l'HPSE semblaient se situer dans les zones à caractère invasif de la tumeur, alors que le tissu sain adjacent ne présentait aucun signal détectable [64]. Également, plusieurs études de suivi clinique ont



Chez les mammifères, elle est décrite comme la seule enzyme connue capable de cliver les chaînes d'héparanes sulfates (HS) des protéoglycanes [65]. Les HS sont des glycosaminoglycanes (GAG), décrits pour être des composés majeurs de la MEC [65]. Ils sont composés par des unités disaccharidiques répétitives de D-glucosamine (GlcN) reliées par une liaison osidique de type  $\alpha$ -1,4 à un acide glucuronique (GlcA) ou un acide iduronique (IdoA) (**Figure 18 A**) [231,232]. Le polymère de ces GAG est formé lors de leur biosynthèse à travers l'enchaînement de ces unités disaccharidiques par des liaisons  $\beta$ -1,4 [232]. Des modifications dans la chaîne peuvent avoir lieu à différentes positions, comme par exemple, une N-acétylation, une N-sulfatation ou encore une O-sulfatation, principalement en position 6 et dans de rares cas en position 3 des résidus GlcN [232]. Le clivage des liaisons  $\beta$ -glycosidiques des chaînes d'HS par l'HPSE a lieu entre une GlcN et un GlcA ou IdoA (**Figure 18 B**). Grâce à l'utilisation de substrats naturels et/ou synthétiques, il a pu être montré qu'un trisaccharide était le motif minimum de reconnaissance des HS par l'HPSE [233]. En revanche, il a été suggéré que le profil de sulfatation aurait plus d'influence sur la reconnaissance de ce substrat par rapport à la séquence saccharidique sulfatée elle-même [233]. Ce clivage va être à l'origine d'un remodelage de la MEC, s'accompagnant de la libération de fragments constitués de domaines sucres sulfatés liés à des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines [64,65,234]. Ces derniers peuvent par la suite se fixer sur des récepteurs membranaires et déclencher des voies de signalisation, impliquées notamment dans des processus pathologiques tels que l'invasion, l'angiogenèse et la prolifération des cellules cancéreuses [64,65,234].

#### 4.3. Le rôle de l'héparanase dans la progression tumorale

L'HPSE intervient dans la progression tumorale à travers son activité enzymatique et non enzymatique et cela aussi bien dans différents compartiments incluant le milieu extracellulaire qu'intracellulaire. Dans cette partie, nous allons présenter quelques exemples de processus clés du développement et de la progression tumorale soutenus par l'action de l'HPSE, incluant l'induction de l'angiogenèse, la favorisation de l'inflammation tumorale, l'activation de l'invasion et des métastases, etc (**Figure 19**).



**Figure 19.** Schéma récapitulatif de processus tumoraux clés favorisés par l'HPSE dans le microenvironnement tumoral [65].

#### 4.3.1. Effets médiés par son activité enzymatique

##### 4.3.1.1. Rôle dans la prolifération tumorale

Les HS séquestrent des protéines dites « HS binding proteins (HSBP) » qui régulent la prolifération cellulaire en induisant des transductions de signal. Ainsi, le remodelage de la MEC à travers le clivage des HS *via* l'HPSE, permet de libérer ces HSBP, augmentant la prolifération cellulaire [65]. Par exemple, la signalisation impliquant « l'epidermal growth factor » (EGF) et son récepteur (EGFR) est une voie clé dans la régulation du cycle cellulaire, favorisant la prolifération cellulaire, et donc la promotion de nombreux cancers [65]. Il a été démontré que l'HPSE était capable de déclencher le signal EGFR à travers le clivage des HS, et spécifiquement *via* la libération des syndécans [65]. Cette action a été démontrée comme favorisant la résistance à la chimiothérapie dans le cancer colorectal [65].

##### 4.3.1.2. Rôle dans l'angiogenèse tumorale

En plus de la prolifération, l'angiogenèse est également un trait de caractère acquis par les cellules tumorales [65]. Il s'agit d'un processus de néovascularisation résultant de l'activation d'un « inducteur angiogénique », provoquant la croissance continue de nouveaux vaisseaux. En plus de favoriser la croissance de la tumeur primaire, l'angiogenèse favorise

également les métastases en offrant un moyen d'évasion aux cellules cancéreuses [65]. L'activité enzymatique de l'HPSE favorise l'angiogenèse tumorale en activant les voies de signalisation du VEGF et du « fibroblast growth factor » (FGF) par clivage des HS [65]. De nombreuses études utilisant des modèles précliniques de maladies et des échantillons de tumeurs de patients, ont démontré le rôle clé de l'HPSE dans l'activation du déclenchement angiogénique [65].

L'étude de Jiang *et al.* 2012 a démontré que l'inhibition de l'HPSE par des ARN interférants diminuait la vascularisation tumorale corrélée à une réduction des niveaux de facteurs pro-angiogéniques dans le MET [235].

#### 4.3.1.3. Activation de la formation des métastases

La caractéristique la plus redoutable d'un cancer est sa capacité d'acquies des propriétés d'invasion et de formation de métastases, entraînant la dissémination de cellules malignes depuis leur foyer primaire vers un foyer secondaire. Les cellules cancéreuses acquies la capacité d'invasion à travers le phénomène de la transition épithelio-mésenchymateuse (TEM) [65]. Cette dernière est un processus biologique durant lequel des cellules épithéliales acquies un phénotype mésenchymateux associé à une capacité élevée de migration, d'invasion et de résistance à l'apoptose, avec une augmentation de la production d'enzymes hydrolytiques [236]. L'HPSE a notamment été décrite dans ces processus, par sa capacité indirecte à activer les voies de signalisation clés de cette transition dépendante du FGF et du « transforming growth factor beta » (TGF- $\beta$ ) [64,65].

#### 4.3.1.4. Rôle dans l'inflammation tumorale

L'implication de l'HPSE dans la régulation du système immunitaire a été démontrée dans les années 80 à travers des études menées sur des fragments d'HS dégradés par l'HPSE [237]. L'héparine, un inhibiteur connu de l'HPSE d'origine animale a montré des propriétés anti-inflammatoires, confortant l'hypothèse d'une implication de l'HPSE dans les réactions inflammatoires [238]. D'autres études ont associé la surexpression de l'HPSE à de nombreuses pathologies inflammatoires dont le diabète et l'athérosclérose, à travers un recrutement conséquent des leucocytes, un relargage de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires favorisant la migration des cellules immunitaires [239].

Parmi les cytokines pro-inflammatoires libérées à partir des fragments d'HS générés par l'action enzymatique de l'HPSE, sont retrouvées : l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$ , capables de se fixer sur le récepteur Toll-Like-Receptor 4 et d'induire la différenciation myéloïde en déclenchant la voie de signalisation MyD88 chez les monocytes [240].

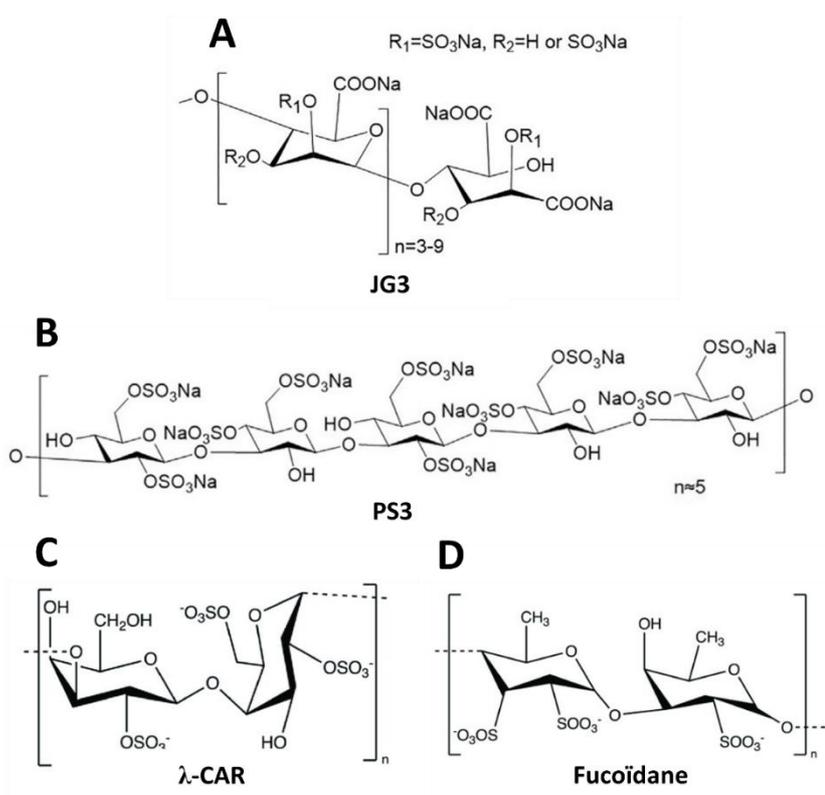
#### 4.3.2. Effets médiés par son activité non enzymatique

A côté de son activité enzymatique, l'HPSE peut également intervenir dans la cancérogenèse indépendamment de son activité enzymatique en régulant l'expression génique et en favorisant l'adhésion cellulaire [65,228]. Par exemple, elle est capable d'agir en tant que facteur de transcription pour induire l'expression du gène codant pour le VEGF [241]. Également, au travers de sa capacité à se fixer sur la sous unité  $\beta$ 1 des intégrines présentes sur les cellules endothéliales, elle induit l'expression du facteur inductible par l'hypoxie 2, qui va à son tour induire la migration des cellules et l'angiogenèse [242]. Une étude a montré qu'à travers son activité non-enzymatique en agissant sur des voies de signalisation impliquant des facteurs d'adhésion cellulaire (FAK et ICAM-1), l'HPSE pouvait être impliquée dans la formation de grappes de cellules tumorales circulantes (CTC), favorisant ainsi leurs métastases dans le TNBC [243].

#### 4.4. Les inhibiteurs de l'héparanase d'origine algale

Tous les travaux faisant de l'HPSE une cible thérapeutique dans le cancer ont fortement soutenu la recherche de molécules inhibitrices de son activité, avec l'objectif de pouvoir ralentir la progression tumorale [65]. L'ensemble des inhibiteurs développés consiste en des mimes structuraux des HS « heparan-like molecules » visant à inhiber l'activité enzymatique de l'HPSE [244]. L'héparine de BPM et ses dérivés semi synthétiques sont pour l'instant démontrés comme les meilleurs inhibiteurs de l'HPSE, et ce grâce à leur analogie structurale avec les HS. Certains de ces inhibiteurs ont pu franchir le stade clinique comme par exemple le **Roneparstat®** (SST0001), une forme d'héparine non-anticoagulante modifiée chimiquement par N-acétylation et glycosplit pour diminuer son effet anticoagulant. Cette molécule a atteint la phase I (NCT01764880) en 2012 pour le traitement du myélome multiple réfractaire avancé, mais n'a pas poursuivi son avancée clinique jusqu'à présent, en raison d'un effet anti-myélome indirect [244,245].

Malgré les nombreux efforts consacrés, aucun des inhibiteurs développés à base de l'héparine n'a été validé en clinique en raison de leur hétérogénéité et de leur affinité pour de multiples cibles, induisant des effets indésirables [59,228,245,246]. Par conséquent, il est donc d'intérêt de continuer la recherche de molécules potentielles inhibitrices de l'HPSE, dépourvues de ces effets délétères, et d'origine autre qu'animale. Dans cet objectif les PS et OS d'origine algale ont gagné une grande attention depuis les années 80, notamment depuis les dix dernières années, et cela grâce à la présence de groupements sulfates. Cette caractéristique fait d'eux des molécules *à priori* d'intérêt quand il s'agit de cibler l'HPSE.



**Figure 20.** Structures chimiques des inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'HPSE d'origine algale. **JG3** : sulfate d'oligomannurate, **PS3** : laminarines sulfatées, **λ-CAR** : λ-carraghénane [63].

Dans cette partie nous présenterons quatre types d'inhibiteurs de l'HPSE d'origine algale incluant le sulfate d'oligomannurate (JG3, semi-synthétique), le PS3 (synthétique), les λ-CARs/COs et les fucoïdanes natifs/F-Os (non synthétiques). Ces derniers étant les sucres d'intérêt dans ces travaux de thèse.

#### 4.4.1. Le sulfate d'oligomannurarate (JG3)

Le JG3 est un composé semi-synthétique obtenu par une sulfatation à l'acide chlorosulfonique de l'oligomannurarate obtenu par une dépolymérisation au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de l'alginate de sodium, issu d'algues brunes marines (**Figure 20 A**) [247]. Sa taille peut aller d'un tétra à un déca-saccharide [63]. Il exerce son activité anti-HPSE *via* sa fixation aux domaines de liaison (KKDC et QPLK) des substrats de l'HPSE [247]. Ce dérivé agit également sur la croissance tumorale en se fixant sur le facteur de croissance FGF- $\beta$  lié aux HS, empêchant ainsi sa libération et inhibant la voie de signalisation ERK-1/2 impliquée dans la prolifération et la migration cellulaire [247]. Des études ont également montré qu'il s'agirait d'un agent anti-mitotique efficace bloquant la prolifération des cellules cancéreuses. De plus, il aurait également un effet anti-tumoral à travers la diminution de l'activation des protéines de la cascade de signalisation de la voie NF- $\kappa$ B [63].

#### 4.4.2. Les laminarines sulfatées (PS3)

Le PS3, une laminarine sulfatée, est également un composé semi-synthétique, dérivant du  $\beta$ -1,3 glucane phycarine extrait des sporophytes de l'algue brune *Laminaria digitata* (**Figure 20 B**) [63,248]. Il a un PM de 10 kDa, et il est obtenu par une sulfatation chimique du PS natif *via* le complexe SO<sub>3</sub>-pyridine [63,248]. Il a été décrit pour posséder de hautes propriétés anti-inflammatoires avec une faible activité anti-coagulante par rapport à l'héparine [63]. Le PS3 est très efficace pour inhiber l'HPSE avec une IC<sub>50</sub> de 0,08  $\mu$ g/mL [63,249]. Cette inhibition dépendante du DS et de la structure de base, passe à travers une compétition de liaison de l'HPSE à ses substrats [249]. Son efficacité comme agent thérapeutique anti-tumorale et anti-inflammatoire a été associée à sa capacité d'interférer avec les sélectines P- et L- [63].

#### 4.4.3. Les $\lambda$ -CARs et les fucoïdanes natifs, et leurs dérivés OS

Précédemment dans l'étude bibliographique, les activités anti-cancéreuses des  $\lambda$ -COs et des F-Os ont été présentées sans faire de lien avec l'HPSE. En revanche, cette dernière sous-partie de l'étude bibliographique, sera exclusivement dédiée au potentiel de ces OS à inhiber notre cible d'intérêt l'HPSE dans le cancer.

Parmi les PS d'origine algale, mis à part les laminarines qui ont été modifiées par sulfatation (PS3), seuls les  $\lambda$ -CARs et les fucoïdanes ont montré des effets prometteurs dans le

cadre de l'inhibition de l'HPSE. En ce qui concerne les autres types principaux de CARs, à savoir le  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs natifs, les études ont démontré que l'activité anti-HPSE du  $\kappa$ -CAR natif restait soit inférieure ou inexistante à celle du  $\lambda$ -CAR natif [22,24]. Ces résultats sont en accord avec ceux issus de la thèse de Nicolas Poupard en 2017, qui au sein de notre équipe, avait démontré que l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE par un  $\lambda$ -CAR natif, était supérieure à celle d'un  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs natifs [69]. De plus, mis à part dans ces travaux de thèse, la capacité du  $\iota$ - CAR/CO à inhiber l'HPSE, n'a jamais été investiguée à ce jour.

Avant de relater l'inhibition de cette enzyme par les  $\lambda$ -COs et les F-Os, nous allons brièvement rappeler les études faites sur leurs PS natifs respectifs.

#### 4.4.3.1. Activité anti-HPSE des $\lambda$ -CARs natifs

L'activité anti-HPSE de  $\lambda$ -CARs natifs (**Figure 20 C**) a été démontrée pour la première fois en 1987 par Parish *et al.* Ils ont observé que le  $\lambda$ -CAR commercial (des espèces *Gigartina aciculaire* et *Gigartina pistillata*) avait une capacité à inhiber la dégradation des composés de la MEC tout en ayant un effet anti-métastatique sur un adénocarcinome mammaire de rat hautement métastatique (lignée 13762 MAT) [22]. En revanche, dans cette même étude, le  $\kappa$ -CAR natif avait eu un effet très faible sur l'inhibition de l'HPSE et aucun effet anti-métastatique. **Dans cette étude, les effets n'ont pas été testés sur des cellules normales. De plus, aucune information n'a été communiquée sur le PM ni le DS, et aucune caractérisation structurale poussée n'a été réalisée. Également, il n'y a pas eu d'étape de fractionnement au KCl afin d'écartier la présence de  $\kappa$ -CAR dans le produit commercial.**

En 1990, Ishai-Michaeli *et al.* ont également démontré que contrairement au  $\kappa$ -CAR natif, le  $\lambda$ -CAR commercial natif inhibait l'activité enzymatique de l'HPSE exprimée par des plaquettes, des neutrophiles et des cellules de lymphome [24]. **Dans ces travaux, la connexion avec un processus tumoral (migration, invasion, angiogenèse) n'a pas été étudiée. Également, aucune information n'a été communiquée sur le PM ni le DS, et aucune caractérisation structurale poussée n'a été réalisée. Également, il n'y a pas eu d'étape de fractionnement au KCl afin d'écartier la présence de  $\kappa$ -CAR dans le produit commercial.**

Les études se sont poursuivies avec les travaux de Kosir *et al.* en 1997 puis en 1999 [250,251]. Ils ont démontré que le  $\lambda$ -CAR natif (à 10  $\mu\text{g/mL}$ ) pouvait inhiber à une moyenne de 54,1 % la dégradation des HSPG, qui était induite par l'HPSE exprimée par les lignées

---

cellulaires humaines du carcinome de la prostate PC-3M et LNCaP C4-2. **Dans ces travaux, l'effet sur un processus tumoral (migration, invasion, angiogenèse) n'a pas été étudié. Également, aucune information sur la provenance du  $\lambda$ -CAR natif n'a été communiquée. De plus, aucun fractionnement au KCl, ni caractérisation structurale n'ont été réalisés sur celui-ci.**

Plus récemment, l'étude de Rabelink *et al.* 2017 a montré par modélisation moléculaire un modèle de fixation du  $\lambda$ -CAR (à travers son motif sulfaté répétitif du di-galactopyranose) sur le site actif de l'HPSE, pouvant bloquer ainsi son activité catalytique. Cela se fait par compétition en se liant aux deux domaines de liaisons aux substrats HS (HSBD1 et HSBD2) au sein de l'enzyme [246]. **Néanmoins, cette étude n'a pas été accompagnée de mécanismes enzymatiques poussés pour expliquer quels étaient les motifs indispensables à l'inhibition de l'HPSE.**

#### 4.4.3.2. Activité anti-HPSE des fucoïdanes natifs

Concernant le lien entre les fucoïdanes natifs (**Figure 20 D**) et l'HPSE, comme pour le  $\lambda$ -CAR natif, la même étude de Parish *et al.* 1987, a démontré que le fucoïdane commercial (de l'espèce *Fucus vesiculosus*) avait une capacité à inhiber la dégradation de la MEC tout en présentant un effet anti-métastatique sur un adénocarcinome mammaire hautement métastatique (lignée 13762 MAT) provoqué chez le rat [22].

En 2013, Zhu *et al.* ont démontré que les effets anticancéreux d'un fucoïdane commercial (espèce non précisée) avaient été induits par une inhibition de la prolifération des cellules tumorales, et cela en absence d'effets anti-angiogéniques [41]. En effet, il était incapable (à 10, 100 et 200 $\mu$ g/mL) d'inhiber les niveaux protéiques des molécules proangiogéniques (VEGF, bFGF et IL-8) et celle de l'HPSE dans la lignée cellulaire humaine du carcinome hépatocellulaire HepG2. De plus, le fucoïdane natif a présenté une faible affinité au bFGF. Il est bien décrit que le bFGF est un facteur de croissance impliqué dans la prolifération, la migration, l'invasion et la différenciation, de nombreux types cellulaires, notamment dans le cas du cancer [252]. Bien que ce PS semble n'avoir aucun effet sur l'HPSE ni sur l'angiogenèse *in cellulo* sur les HpeG2, le traitement (200 mg/kg) de souris xénotreffées (injectées par les cellules humaines du carcinome hépatocellulaire Bel-7402), a permis de réduire le poids de la tumeur de 36%. **Dans cette étude, le PS n'a pas été testé sur des souris**

---

**non cancéreuses. Également, aucune caractérisation structurale (y compris le PM et DS) n'a été réalisée.**

Plus récemment, en 2017, une équipe de chercheurs a comparé les effets anti-HPSE du Gubenyiliu II (GYII, une formule médicinale traditionnelle chinoise composée de 13 plantes) à ceux d'un fucoïdane natif commercial (espèce non précisée), sur des modèles murins de cancer du sein (4T1) [43]. Le traitement avec le GYII (à 5 g/kg) et le fucoïdane (à 0,2 g/kg), administrés par voie intra-gastrique, a induit une diminution de la progression de la tumeur et une suppression significative des métastases pulmonaires spontanées de 37,1 % et 45,9 %, respectivement pour les deux traitements. De plus, les niveaux protéiques de l'HPSE et du bFGF ont été significativement diminués en présence des deux traitements (pas de différences entre les deux) (à 450 µg/mL pour le GYII, et à 40 µg/mL pour le fucoïdane). De plus, l'effet du fucoïdane a été accompagné par la diminution de la phosphorylation de protéines (ERK, Akt, PI3K) régulées par l'HPSE et impliquées dans les processus de prolifération et de migration dans le cancer, tandis que le GYII n'a eu un effet que sur la protéine Akt. **Dans cette étude, le PS n'a pas été testé sur des souris non cancéreuses. Également, aucune caractérisation structurale n'a été réalisée sur le PS (y compris le PM et le DS).**

#### 4.4.3.3. [Activité anti-HPSE des oligosaccharides de λ-carraghénanes \(λ-COs\)](#)

Niu *et al.* 2015, ont produit des λ-COs à partir d'un λ-CAR commercial par une enzyme isolée de la bactérie *Pseudoalteromonas carrageenovora* [42]. Après purification des λ-COs, des fractions de degrés de polymérisation (DP) de 2 à 8 ont été collectées. Les résultats de viabilité cellulaire (mesurée par MTT) mesurée sur la lignée humaine de cellules endothéliales HuVECs n'ont montré aucun effet significatif des λ-COs. La prolifération (mesurée par MTT) des cellules HuVECs induite par l'ajout du bFGF a été inhibée par les λ-COs de manière dose dépendante (après 24h de traitement) [42]. À 200 µg/mL d'un λ-CO de DP 7, la plus haute inhibition de cette prolifération induite par le bFGF, a été de 52,09 %. Les résultats ont également montré que seul ce λ-CO à DP 7 était capable de se fixer au bFGF, et cela en tant que ligand avec une constante d'affinité de 2,77 µM (mesuré par interférométrie), supérieure à celle de la suramine (connue pour sa capacité à bloquer l'interaction FGF-FGFR). De la même manière, la mesure de l'activité anti-HPSE (sur les lysats cellulaires) a montré que ce composé était le plus efficace à inhiber l'HPSE, avec un maximum d'inhibition de 46,65 ± 3,52 % obtenu à 2 µM. Enfin, l'impact de ce composé sur l'invasion des cellules HuVECs a montré une

---

inhibition significative dose dépendante à 0,2-20  $\mu\text{M}$ . L'ensemble de ces résultats a démontré que ce candidat présentait une activité anti-proliférative et anti-invasive à travers une liaison antagoniste sur le bFGF et une inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE dans les cellules HuVECs. **Dans cette étude, le fractionnement au KCl n'a pas été réalisée afin de séparer le type  $\lambda$ - du  $\kappa$ -. En revanche, le  $\lambda$ -CO produit a été purifié (sur membrane et par chromatographie d'exclusion stérique), puis caractérisé structurellement par FT-IR et LC-MS. Néanmoins, son DS n'a pas été déterminé.**

Dans une étude publiée par Poupard *et al.* 2017 au sein de notre équipe, plusieurs techniques de dépolymérisation ont été combinées afin de sélectionner le meilleur candidat  $\lambda$ -CO sur la base d'une activité inhibitrice de l'HPSE effective combinée à une faible activité anti-coagulante [253]. Un candidat de 11 kDa produit en couplant la dépolymérisation radicalaire par le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) avec une technique de glycol split (consistant à l'ouverture des cycles pyranose), a été sélectionné car répondant aux critères des bioactivités cibles. En effet, il avait montré la plus faible activité anti-coagulante associée à une bonne inhibition de l'HPSE traduite par une valeur d' $\text{IC}_{50}$  de 7,32  $\mu\text{g/mL}$ , proche de celle de l'héparine native, la molécule de référence en termes d'inhibition de l'HPSE. De plus, ce  $\lambda$ -CO n'a exercé aucun effet cytotoxique (mesurée par MTT) quand il a été mis en contact des cellules endothéliales humaines de type HskMECs. Dans la même année, la suite des travaux a montré un effet anti-angiogénique du même  $\lambda$ -CO [72]. En effet, un traitement par 200  $\mu\text{g/mL}$  de ce candidat, inhibait de 48% de la formation des vaisseaux sur les HskMECs, après 7h de traitement. Néanmoins, cette activité n'était pas exclusivement à relier à l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE, mais également par la capacité de l'OS à se lier à des facteurs de croissance comme démontré par l'étude de Niu *et al.* 2015 [42].

Les études sur l'inhibition de l'HPSE par les  $\lambda$ -COs se sont poursuivies dans notre équipe avec la publication de Groult *et al.* 2019, montrant une activité anti-migratoire de 32,8% d'un nouveau  $\lambda$ -CO de plus petit PM (5,9 kDa) à 100  $\mu\text{g/mL}$  et après 24h de traitement, sur un modèle cellulaire du TNBC (lignée MDA-MB-231) [48]. Ce  $\lambda$ -CO n'avait pas présenté pour autant une activité anti-HPSE importante. Afin de mieux comprendre l'effet anti-migratoire de ce  $\lambda$ -CO sur ces cellules, et d'établir le lien avec l'inhibition de l'HPSE, un intérêt a été porté sur l'étude du mécanisme d'action de ce composé dans ces cellules MDA-MB-231 [58]. Les résultats n'ont montré aucun effet cytotoxique (mesuré par MTT) du  $\lambda$ -CO sur ces cellules. En

revanche testé à 100 µg/mL, il pouvait réduire *in vitro* de 60% la capacité de migration, et de 37% la capacité de l'invasion, après 24h de traitement. Ce composé a également réduit l'expression génique de l'HPSE. Les MMP connues pour leur implication dans la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231, sont très liées à l'HPSE. Le λ-CO avait réduit significativement l'expression génique et protéique de l'HPSE. De plus, l'activité de la MMP-2 a été inhibée de 86%, avec une inhibition de l'expression génique et des niveaux protéiques de la MMP-14, affectant en retour l'activation de la MMP-2. La régulation des niveaux de l'HPSE par ce λ-CO, affectant en conséquence, les MMP-14 et MMP-2, et permettant d'inhiber l'invasion et la migration des cellules cancéreuses mammaires, a été démontrée. Cela a été proposé comme un possible mécanisme de son mode d'action sur ce type cellulaire. Dans cette dernière étude, bien que l'IC<sub>50</sub> de l'activité anti-HPSE du λ-CAR natif était nettement meilleure que celle du λ-CO, l'activité anti-migratoire et anti-invasive de ce dernier était beaucoup plus importante.

**À ce stade dans les travaux de notre équipe, l'intérêt n'était pas encore porté sur les questions de l'hétérogénéité structurale au sein des formulations de λ-COs.**

#### 4.4.3.4. [Activité anti-HPSE des oligosaccharides de fucoïdanes \(F-Os\)](#)

Contrairement aux λ-COs, à notre connaissance, l'étude de Li *et al.* 2017 est la seule faisant mention d'un lien entre l'inhibition de l'HPSE par des F-Os dans le cancer, jusqu'à présent [254]. Ils ont démontré que dans les cellules tubulaires proximales rénales normales humaines HK-2, une formulation purifiée de BPM dite F1.0 de 8,07 kDa, et d'un DS de 35,94 % (obtenue par dépolymérisation radicalaire du PS natif extrait de l'algue brune *Laminaria japonica*) était capable d'inhiber la TEM rénale induite par un traitement au TGF-1 et FGF-2. Cette inhibition a été marquée par une diminution de l'expression génique et protéique des marqueurs (α-SMA et Fn) caractéristiques des cellules au phénotype mésenchymateux. Parallèlement, cette même formulation a également inhibé les niveaux d'expression de l'acide ribonucléique (ARN) messager de l'HPSE et de la MMP-9, mais a induit une augmentation de l'expression du syndécan-1, un type d'HS décrit comme substrat de l'HPSE. La dégradation du syndécan-1 par l'HPSE a été décrite pour induire une augmentation de l'expression des MMP-9, l'une des enzymes les plus importantes dans la TEM rénale. Par rapport à la formulation de F-O non purifiée (8,84 kDa, DS 28,45 %), et à une autre formulation purifiée (6,71 kDa, DS 25,04 %), les effets de la formulation F1.0 étaient plus élevés, probablement grâce à son DS

plus élevé et sa composition saccharidique riche en fucose. Ainsi, dans ce travail, il a été suggéré que la formulation F1.0 atténuait la TEM à travers une diminution de l'expression de l'HPSE, augmentant l'expression du syndécan-1, et induisant une diminution de l'expression des MMP-9. **Dans cette étude, le fucoïdane natif n'a pas été utilisé comme un contrôle supplémentaire.**

Par ailleurs, les effets des fucoïdanes natifs ou dépolymérisés sur l'HPSE ont été testés dans d'autres contextes pathologiques que le cancer. Par exemple, dans le cas de l'ischémie reperfusion, un F-O de 8 kDa (obtenu par dépolymérisation au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du PS extrait de l'espèce *Fucus vesiculosus*) a été démontré pour induire un effet pro-angiogénique recherché, en augmentant l'expression génique et protéique ainsi que l'activité enzymatique de l'HPSE [255]. Également, dans le cadre de la glomérulonéphrite (troubles rénaux), il a été démontré pour la première fois qu'un fucoïdane natif (extrait de l'espèce *Laminaria japonica*) était capable de diminuer l'activité enzymatique de l'HPSE [256].

L'ensemble des études traitant de l'activité anti-HPSE des PS/OS algaux (non synthétiques) dans le cancer est englobé dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7.** Récapitulatif des études réalisées sur les  $\lambda$ -CARs et fucoïdanes natifs, ainsi que leurs OS respectifs dans le cancer en lien avec l'HPSE. **TEM** : transition épithélio-mésenchymateuse. **HSPG** : héparanes sulfates protéoglycanes. **MEC** : matrice extracellulaire. **CTC** : cellules tumorales circulantes.

PS/OS	PM (kDa)	DS (%)	Effet anti-HPSE	Effet anti-cancéreux associé	Référence
$\lambda$ -CAR natif	-	-	Inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE (dégradation de la MEC) exprimée par les cellules métastatiques de l'adénocarcinome de rat (lignée 13762) IC <sub>50</sub> = 1,5 $\mu$ g/mL <i>(in cellulo)</i>	Anti-métastatique sur un adénocarcinome mammaire de rat hautement métastatique (lignée 13762 MAT) <i>(in cellulo)</i>	[22]
	-	-	Inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE (dégradation de la MEC) exprimée par les plaquettes, neutrophiles et cellule du lymphome IC <sub>50</sub> = 2,5 $\mu$ g/mL <i>(in cellulo)</i>	-	[24]
	-	-	Inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE (dégradation des HSPG de 54,1 %) du cancer de la prostate (lignées PC-3M et LNCaP C4-2) <i>(in cellulo)</i>	-	[250,251]
Fucoïdane natif	-	-	Inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE (dégradation de la MEC) exprimée par les cellules métastatiques de l'adénocarcinome de rat (lignée 13762) IC <sub>50</sub> = 2,75 $\mu$ g/mL <i>(in cellulo)</i>	Anti-métastatique sur un adénocarcinome mammaire de rat hautement métastatique (lignée 13762 MAT) <i>(in cellulo)</i>	[22]

	-	-	Aucun effet sur les niveaux protéiques dans la lignée cellulaire humaine du carcinome hépatocellulaire HepG2 <i>(in cellulo)</i>	Inhibition (indépendante de l'HPSE) de la progression tumorale sur des xenogreffes murines du cancer hépatique humain (Bel-7402) <i>(in vivo)</i>	[41]
	-	-	Diminution des niveaux protéiques de l'HPSE sur la lignée murine du TNBC (4T1) <i>(in cellulo)</i>	Inhibition de la progression tumorale et suppression des métastases sur des modèles murins du TNBC (4T1) <i>(in vivo)</i>	[43]
λ-COs	DP 7		Inhibition maximale (46,65 %) obtenue à 2 μM <i>(in cellulo)</i>	Anti-prolifératif sur les cellules HuVECs (endothéliales humaines) <i>(in cellulo)</i>	[42]
	11		IC <sub>50</sub> = 7,32 μg/mL <i>(in vitro)</i>	Anti-angiogénique sur les cellules HskMECs <i>(in cellulo)</i>	[72,253]
	5,9	17,8	Diminution de l'expression génique et protéique de l'HPSE IC <sub>50</sub> = 6 μg/mL <i>(in vitro)</i>	Anti-migratoire et anti-invasif sur les cellules MDA-MB-231 (cancer du sein humain) <i>(in cellulo)</i>	[48,58]
F-Os	8,07	35,94	Diminution de l'expression génique <i>(in cellulo)</i>	Inhibition de la TEM sur les cellules HK-2 induite par le TGF-β et FGF-2 (normales rénales humaines) <i>(in cellulo)</i>	[254]

En analysant toutes ces études, il est possible de constater que :

- Les  $\lambda$ -COs sont beaucoup plus étudiés que les F-Os dans le cancer pour leur lien avec l'HPSE.
- Une seule étude a été réalisée démontrant un lien des F-Os avec l'HPSE dans un contexte tumoral.
- L'effet des OS en lien avec l'HPSE est contexte pathologique dépendant.
- Comme l'a démontré l'étude de Cousin *et al.* 2021, il est important de s'intéresser au mécanisme d'action d'un candidat sur les expressions génique et protéique de l'HPSE, et de ne pas se limiter à son effet sur l'activité enzymatique de celle-ci.

## **Problématiques et objectifs de la thèse**

L'analyse de l'état de l'art centrée sur les PS de  $\lambda$ -CARs et de fucoïdanes, et passée sous le filtre des 4 défis présentés en **introduction** (*1-Standardisation, 2- Criblage, 3- Compréhension, 4-Purification*), nous a permis de dégager deux points majeurs, qui seront à la base de ces travaux doctoraux :

### **1<sup>er</sup> POINT ET OBJECTIFS DU CHAPITRE 1**

Les  $\lambda$ -CARs commerciaux sont particulièrement pertinents et illustratifs du *défi 1-Standardisation* qui aborde les difficultés liées à la matière première commerciale, telles que son hétérogénéité structurale et le mélange d'espèces, reliés à plusieurs facteurs dont la variabilité environnementale des espèces algales et les pratiques d'extraction industrielles. En effet, comme exposé dans l'étude bibliographique (voir **2.4**), en plus de la relation de dépendance des structures produites aux espèces algales et/ou à l'environnement (problème commun à tous les PS algaux), les  $\lambda$ -CARs présentent une autre relation de dépendance spécifique liée à leur cycle de reproduction. Nous savons qu'ils ne sont produits qu'au stade tétrasporophyte du cycle de reproduction de l'algue, contrairement aux stades gamétophytes, qui eux, produisent majoritairement des hybrides de kappa ( $\kappa$ )- et d'iota ( $i$ )-CARs. Ces différents stades tétrasporophytes et gamétophytes étant difficiles à distinguer macroscopiquement, ils sont prélevés ensemble en mélange lors de leur récolte du milieu naturel. De plus, les pratiques industrielles courantes pour l'extraction et le primo-raffinage des CARs n'incluent pas d'étape de séparation des différents sous-types, aboutissant de ce fait à un mélange d'espèces de différentes familles de CARs. Ainsi, selon la législation, la production destinée à l'industrie agroalimentaire ou la cosmétique affiche un produit de  $\lambda$ -CAR sur la base de ses propriétés texturantes et non de la présence majoritaire d'un type de macromolécules. Le produit pouvant de même être modulé par l'ajout d'additifs (glucose, autre PS, autres familles de CARs).

Sur la base de ce premier constat, **notre objectif a été de mieux comprendre les impacts de ces problématiques sur la production de nos formulations de  $\lambda$ -COs anti-HPSE et anti-migratoires pour relever les défis de translation vers la clinique.** Pour ce faire, nous avons réalisé un large criblage de  $\lambda$ -COs d'application thérapeutique produits à partir de différents  $\lambda$ -CARs natifs de plusieurs fournisseurs. Les  $\lambda$ -CARs natifs ainsi que leurs dérivés de  $\lambda$ -COs respectifs ont été comparés sur deux plans (caractérisations structurales et activités biologiques)

afin de faire ressortir les influences éventuelles des variations présentes dans les différents  $\lambda$ -CARs natifs de différents fournisseurs.

Dans cet objectif, nous avons mené une étude structure-fonction sur la capacité des OS issus d'autres types de CARs ( $\kappa$ - et  $\iota$ -) à inhiber l'HPSE, s'inscrivant ainsi de manière secondaire dans le **défi 2- Criblage**. Enfin, dans ce **Chapitre 1**, nous avons également évalué le potentiel des  $\lambda$ -COs anti-HPSE, obtenus à partir des différents fournisseurs, à réguler les capacités de migration des cellules Huh-7, modèles d'un hépatocarcinome humain. Outre l'étude sur l'impact de la variation qualitative des matières premières commerciales, cette partie de notre étude nous a également permis d'aborder le **défi 3- Compréhension**. En particulier, l'aspect concernant la pertinence d'un criblage phénotypique *in vitro* monoparamétrique et son aptitude à prédire les effets *in cellulo* ou *in vivo* résultants, pour les OS, mais aussi de vérifier si les effets sont « contexte pathologique dépendants » en les comparant à ceux obtenus sur la lignée MDA-MB-231 dans des travaux précédents.

## **2<sup>ème</sup> POINT ET OBJECTIFS DU CHAPITRE 2**

Si, parmi les sucres algaux, la famille des  $\lambda$ -COs est particulièrement étudiée pour ses activités anti-HPSE, les F-Os, en revanche, n'ont été que très peu explorés sur ce paramètre. Comme exposé dans l'étude bibliographique (voir **4.4.3**), seuls trois travaux ont étudié les fucoïdanes et/ou leurs dérivés F-Os en lien avec l'HPSE dans le cancer. Ceci est d'autant plus surprenant que comme souligné dans l'état de l'art, les F-Os sont les OS d'origine algale à avoir été les plus étudiés en oncologie, et les plus matures en termes de translation vers la clinique. Sur la base de ce constat qui se place au cœur du **défi 2- Criblage**, **notre objectif était d'examiner l'activité anti-HPSE potentielle des F-Os**. Pour ce faire, nous avons mené une étude structure-fonction sur une série de F-Os produits par une méthode de dépolymérisation radicalaire à base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appliquée à un fucoïdane natif extrait de l'algue brune *Fucus vesiculosus*. Une cinétique de dépolymérisation a été conduite tout en faisant varier le taux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, susceptible d'influencer les structures des F-Os produites et donc leurs bioactivités. Cette variation du taux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'inscrit également de manière secondaire dans le **défi 1- Standardisation**, pour comprendre si cela apporterait une hétérogénéité supplémentaire aux formulations produites. La comparaison de leurs activités anti-HPSE avec celles des  $\lambda$ -COs, obtenues dans le **Chapitre 1**, nous a également permis de progresser dans la compréhension des types d'interactions des sucres algaux à l'origine des effets d'inhibitions observés (spécifiques ou non, sucre-dépendants, sulfate ou longueur dépendants, etc).

De plus, l'étude bibliographique (voir **3.2** et **4.4.3.4**) a également relevé la multitude d'interactions possibles des F-Os avec des cibles anti-tumorales, la diversité de leur mode d'action, et ceci dans divers types de cancer. Sur la base de ce constat qui relève *du défi 3-Compréhension*, nous avons effectué un criblage de l'effet des F-Os sur la migration et la viabilité des cellules cancéreuses en faisant le choix d'un crible sur des lignées de type MDA-MB-231 modèles d'un TNBC, dans laquelle l'HPSE est fortement impliquée. **L'objectif était de nouveau d'examiner la pertinence d'un crible phénotypique *in vitro*, basé sur la mesure de l'activité anti-HPSE des OS produits**, pour prédire des effets sur des modèles cellulaires plus avancés. Dans un second temps, **afin d'approfondir la discussion sur l'aspect de « poly-pharmacologie » dans un « contexte pathologique » différent**, incluse dans le *défi 3-Compréhension*, nous nous sommes appuyés sur un travail collaboratif mené durant le doctorat dans lequel il était question de mesurer les effets de F-Os sur d'autres bioactivités (cytotoxicité et modulation du point de contrôle immunitaire PD-L1) dans un modèle de cancer liquide, un lymphome de type B. Ces travaux nous ont permis d'une part d'interroger la possibilité de tirer parti d'une poly-pharmacologie des F-Os, et d'identifier des contextes tumoraux plus favorables à l'utilisation d'OS anti-HPSE.

## **Partie 2 : Matériels et méthodes**

## 1. Les polysaccharides d'origine algale de la thèse : $\lambda$ -CARs et fucoïdane

Les poudres de  $\lambda$ -CARs natifs ont été obtenues chez cinq fournisseurs différents (Santa-Cruz Biotechnology, Cargill, Merck Sigma-Aldrich, BioSynth, et FMC-Biopolymer). Dans un souci de préservation de l'anonymat de ces échantillons commerciaux, les différents  $\lambda$ -CARs ont été renommés de manière aléatoire (l'ordre ne correspond pas à celui des fournisseurs cités précédemment):  $\lambda$ -CAR du fournisseur\_1 ( $\lambda$ -CAR\_1),  $\lambda$ -CAR du fournisseur\_2 ( $\lambda$ -CAR\_2),  $\lambda$ -CAR du fournisseur\_3 ( $\lambda$ -CAR\_3),  $\lambda$ -CAR du fournisseur\_4 ( $\lambda$ -CAR\_4),  $\lambda$ -CAR du fournisseur\_5 ( $\lambda$ -CAR\_5), et  $\lambda$ -CAR du fournisseur\_6 ( $\lambda$ -CAR\_6).

Le fucoïdane natif provient quant à lui, du fournisseur Sigma-Aldrich, et il est issu de l'espèce d'algue brune *fucus vesiculosus*.

## 2. Méthodologie de production des $\lambda$ -COs et des F-Os

Les OS ont été obtenus par une dépolymérisation radicalaire au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à partir des PS sulfatés commerciaux. Tout d'abord, les poudres ont été dissoutes dans de l'eau MilliQ, à une concentration finale de 5 mg/mL pour les  $\lambda$ -CARs natifs de chaque fournisseur, et à 25 mg/mL pour le fucoïdane natif, suivi d'une purge sous argon. Ensuite, des solutions d' $H_2O_2$  à 30% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ont été ajoutées, avec un ratio de 1,5 (m/m) dans les solutions de  $\lambda$ -CARs natifs (permettant de générer une série de  $\lambda$ -COs, correspondant au  $\lambda$ -CAR natif de chaque fournisseur), et de 0,5 ou de 0,15 (m/m) dans la solution du fucoïdane natif (permettant de générer une série de F-Os par taux de  $H_2O_2$ ). Les mélanges réactionnels ont immédiatement été scellés et placés à 60 ° C sous agitation à 200 rpm. Les formulations ont été collectées à des temps différents jusqu'à 96 h pour les  $\lambda$ -COs, et jusqu'à 120h et 144h pour les F-Os de la série 0,5 et 0,15, respectivement. Après congélation et lyophilisation, les formulations étaient prêtes pour être analysées.

### 3. Caractérisations structurales

#### 3.1. Détermination des poids moléculaires par HPSEC-MALS et par HPSEC-DRI

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) permet la séparation des biomolécules selon leurs PM [257]. La phase stationnaire est composée de particules de billes de silice ou de billes de résines poreuses à base de polyméthacrylate [257]. Lors de la séparation, les molécules de grandes tailles sont complètement exclues en dehors des pores et passent à travers les espaces entre les billes ou la matrice, et sont éluées en premier [257,258]. En revanche, les molécules de petites tailles sont retardées dans les pores constituant la phase stationnaire, et auront donc un temps d'éluion beaucoup plus lent [257,258].

La chromatographie d'exclusion stérique haute pression avec diffusion de lumière multi angles (HPSEC-MALS) n'a été réalisée que sur les  $\lambda$ -CARs natifs de chaque marque, leurs  $\lambda$ -COs respectifs sélectionnés et le fucoïdane natif, pour estimer les caractéristiques macromoléculaires de base (masse moléculaire moyenne en nombre ( $M_n$ ), masse moléculaire moyenne en masse ( $M_w$ ), indice de polydispersité ( $D = M_w/M_n$ )). Cette expérience a été réalisée **en collaboration avec le laboratoire PBS (CNRS UMR 6270) de l'INSA de l'université de Rouen Normandie**, selon une méthode précédemment publiée [259]. L'idée principale du couplage HPSEC-MALS est de pouvoir s'affranchir de l'étalonnage utilisé dans le cas de la HPSEC-DRI. Le détecteur MALS assure un accès en temps réel et simultané aux masses molaires des formulations éluées, et ainsi aux grandeurs moyennes, et cela grâce à la mesure de l'intensité diffusée par les polymères en solution pour différentes concentrations dans le régime dilué et à différents angles. Le système était équipé de deux détecteurs en série : un de diffusion de lumière multi-angles (MALS) contenant un laser He-Ne ( $\lambda = 690$  nm) et une cellule K5 (50  $\mu$ L) (HELEOS II Wyatt Technology Corp, Santa Barbara, CA, USA) ; l'autre mesurant l'indice de réfraction différentiel (DRI) (RID10 A Shimadzu, Kyoto, Japon). Un filtre de 0,1  $\mu$ m (Millipore, et dégazé (DGU-20A3, Shimadzu, Kyoto, Japon) a été utilisé pour filtrer le solvant (0,1 M  $\text{LiNO}_3$ ). Le système SEC était composé d'une colonne de garde OHPAK SB-G et 3 OHPAK SB 806, 804 et 802.5 (pour les  $\lambda$ -CARs natifs) ou bien des colonnes 802 et 802.5 (pour les  $\lambda$ -COs sélectionnées) HQ (Shodex Showa Denko K.K, Tokyo, Japon) éluées en séries avec la solution de  $\text{LiNO}_3$  (0,1 M) à un débit de 0,5 mL/min. Les  $\lambda$ -CARs natifs de chaque fournisseur, leurs  $\lambda$ -COs sélectionnés et le fucoïdane natif, ont été solubilisés sous agitation pendant 48h à des concentrations de 1 g/L, 15 g/L, et 5 g/L, respectivement, dans la solution de

LiNO<sub>3</sub> (0,1 M), respectivement, filtrés (0,45 µm), et injectés avec une boucle (SIL-20A, Shimadzu, Kyoto, Japon) de 100 µL. Le logiciel Astra 6.1.7.16 a été utilisé pour l'analyse de données en utilisant un DRI dn/dc de 0,125 mL/g.

Parallèlement, des analyses structurales et quantitatives de tous les λ-COs et F-Os générés ont été effectuées par chromatographie d'exclusion stérique haute pression avec un détecteur d'indice de réfraction (HPSEC-DRI) en utilisant deux colonnes analytiques successives (TSK-GEL G4000PW et TSK-GEL G3000PWXL, Tosoh, Japan) couplées à un système LC (Agilent Santa Clara, CA, USA) équipé d'un DRI (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Les produits ont été élués en isocratique avec du nitrate de sodium (NaNO<sub>3</sub>) à 0,1 M à un débit de 0,8 mL/min. Les chromatogrammes ont été calibrés en utilisant une série de standards de pullulans (de 1,3 kDa à 806 kDa, Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Germany). Pour les formulations de λ-COs inférieures à 10 kDa, et toutes les formulations de F-Os, leurs masses molaires équivalentes ont été calculées en utilisant une gamme de standards d'héparine (de 1200 Da à 5750 Da, Iduron, UK).

Le M<sub>n</sub>, le M<sub>w</sub>, le Đ, et le degré de polymérisation moyen (DP calculé en utilisant une unité monomère de 160,5 Da pour les λ-COs, et de 117,1 Da pour les F-Os), ont été calculés en utilisant les équations 1, 2, 3, et 4, respectivement.

**Équation 1.** Formule de calcul de la masse molaire moyenne pondérée en nombre (M<sub>n</sub>).

$$M_n = \frac{(\sum N_i \times M_i)}{\sum N_i}$$

**Équation 2.** Formule de calcul de la masse molaire moyenne pondérée en masse (M<sub>w</sub>).

$$M_w = \frac{(\sum N_i \times M_i^2)}{(\sum N_i \times M_i)}$$

**Équation 3.** Formule de calcul de l'indice de polydispersité (Đ).

$$\text{Đ} = \frac{M_w}{M_n}$$

**Équation 4.** Formule de calcul du degré de polymérisation (DP).

$$\text{DP} = \frac{M_n - (M_n \times \text{DS}(\%))}{M_0}$$

**M<sub>n</sub>**: il s'agit de la masse molaire moyenne pondérée en nombre. Elle est calculée en prenant en compte la somme des masses individuelles « M<sub>i</sub> » de toutes les molécules « N<sub>i</sub> » présents dans un échantillon donné, pour donner la fréquence molaire (N<sub>i</sub>\*M<sub>i</sub>), qui est divisée par la somme du nombre total des molécules (**Équation 1**).

**M<sub>w</sub>** : Elle représente la masse molaire moyenne pondérée en poids. Contrairement au M<sub>n</sub>, le calcul de celle-ci prend en compte la distribution des PM en multipliant la somme des fréquence molaires (N<sub>i</sub> \* M<sub>i</sub>) par la somme des masse molaire (M<sub>i</sub>), puis en divisant le résultat sur la somme totale des fréquences molaires (N<sub>i</sub>\*M<sub>i</sub>) (**Équation 2**). Par conséquent, les molécules les plus massives ou les plus abondantes auront un effet plus important sur la valeur finale du M<sub>w</sub> par rapport aux petites molécules ou les moins abondantes, faisant de cette valeur toujours plus élevée que celle du M<sub>n</sub>.

**M<sub>0</sub>** : masse molaire de l'unité monomère. Les hydrogènes impliqués dans les liaisons osidiques, ainsi que les groupements sulfates n'ont pas été pris en compte dans le calcul.

**Đ**: il s'agit de l'indice de polydispersité, indiquant la distribution des poids moléculaires des molécules dans un échantillon. Il est obtenu en divisant le M<sub>w</sub> sur le M<sub>n</sub> (**Équation 3**). Plus la valeur de Đ est élevée, plus il y a une variabilité en termes de poids moléculaire, et *vice-versa*. Par exemple, un polymère monodisperse avec des chaînes égales (par exemple : une protéine) a un Đ = 1. Les meilleurs polymères synthétiques utilisés comme standards de calibrations ont un Đ compris entre 1,02 et 1,10.

**DP** : il s'agit du degré de polymérisation, représentant le nombre moyen d'unités monomères d'une chaîne d'un polymère. Il s'agit également d'une autre façon d'exprimer la taille moyenne d'un polymère. Il est possible de calculer le DP en nombre moyen ou en poids moyen, en faisant le rapport du M<sub>n</sub> ou M<sub>w</sub>, respectivement à la masse molaire de l'unité monomère «M<sub>0</sub>». Dans nos travaux, l'**Équation 4** a été utilisée pour calculer le DP en nombre moyen des PS natifs. Concernant les OS, la masse des groupements sulfates a été soustraite du M<sub>n</sub> total afin d'éviter les artefacts liés à une désulfatation totale de certains OS de très BPM.

Ces définitions ont été reproduites du document Technical Overview « Polymer Molecular Weight Distribution » réalisé par Agilent.

### 3.2. Détermination du degré de sulfatation (DS) par ICP-MS et par un test à l'Azure A

La quantification des sulfates des  $\lambda$ -CARs natifs de chaque fournisseur a été réalisée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). Pour ce faire, 250 mg de chaque produit ont été solubilisés dans un mélange de 67-70% HNO<sub>3</sub>/34-37% HCl (Fisher, trace metal quality) à un ratio de 6:2 (v/v). La digestion acide des échantillons a été réalisée en incubant les mélanges à température ambiante pendant la nuit et ensuite dans un four microondes (Milestone Ehos Up, 30 min avec une augmentation constante de la température jusqu'à 120°C, puis pendant 15 min à la même température). Par la suite, 50 mL d'eau ultrapure ont été ajoutés à chaque échantillon. Les analyses ont été réalisées avec un ICP-AES 5800VDV Agilent et un ICP-MS XSeries 2 Thermofisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Les DS du fucoïdane natif et de l'ensemble des  $\lambda$ -COs et des F-Os générés, ont été déterminés par un test colorimétrique en utilisant le (7-aminophenothiazin-3-ylidene)-dimethylazanium chloride (Azure A, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Ce composé se lie de manière covalente aux groupements sulfatés des composés sulfatés pour former des complexes colorés. Pour réaliser ce test, 20  $\mu$ L de différentes dilutions (0,03 ; 0,04 ; 0,05 mg/mL pour les  $\lambda$ -COs, 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 mg/mL pour le fucoïdane natif et les F-Os) de chaque échantillon ont été déposés sur une plaque de 96 puits. Un volume de 200  $\mu$ L de la solution d'Azure A (dilué à 10 mg/L) a été ajouté, et l'absorbance a été mesurée à 630 nm après une incubation de 10 min. Les DS ont été calculés grâce à une courbe de calibration en utilisant les valeurs d'absorbance obtenues d'une série de dilution (0-0,03 mg/mL) de dextran sulfate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), connu pour avoir une teneur en soufre de 18,1%. La composition en soufre a été transposée en sulfates de la manière suivante : %Sulfates = %Soufre x 3,21.

### 3.3. Dosage des sucres réducteurs par WST-1

La quantification des sucres réducteurs a été réalisée par un test colorimétrique en utilisant le réactif WST-1 5-(2,4 disufofophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium. Ce dernier est converti en formazan par les extrémités réductrices dans un milieu basique, induisant la formation d'une solution colorée en bleu en raison de sa réduction (documentation Interchim « Water Soluble Tetrazolium Salts »). Pour réaliser l'expérience, 100  $\mu$ L de chaque échantillon  $\lambda$ -CO et F-O (dilué à 0,01 et à 0,1 mg/mL, respectivement) sont

déposés dans une plaque de 96 puits, et 100 $\mu$ L de la solution de WST (1,1 mg/mL dans du NaOH (0,1 M)) sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 1h à 60°C, et l'absorbance est mesurée à 600 nm. Les concentrations en extrémités réductrices ont été déterminées par des courbes de calibration en utilisant les valeurs d'absorbance obtenues par une série de dilutions d'une gamme de galactose (0-12  $\mu$ M) pour les  $\lambda$ -COs, et d'une gamme de fucose (0-0,15  $\mu$ M) pour les F-Os.

### 3.4. Analyses par FT-IR

Les spectres de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des poudres de  $\lambda$ -CARs natifs, de fucoïdane natif et des F-Os générés ( $\lambda$ -COs exclus) ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre FTIR PerkinElmer UATR Two, **grâce à la plateforme des analyses élémentaires du laboratoire LIENSs**. Le rayonnement infrarouge absorbé par le PS ou l'OS est exprimé en fonction des longueurs d'ondes bien spécifiques dans un intervalle de 4000-450  $\text{cm}^{-1}$ . Seules les régions 1500-500  $\text{cm}^{-1}$  et 2000-500  $\text{cm}^{-1}$  ont été utilisées pour l'analyse spectrale des  $\lambda$ -CARs natifs et du fucoïdane natif/F-Os, respectivement. Ces longueurs d'ondes sont caractéristiques de la nature et de la conformation du composé analysé et de ses liaisons constitutives. Ainsi, les spectres obtenus représentent une empreinte chimique permettant une pré-identification du type du PS étudié [260]. Chaque spectre résulte d'une moyenne de 64 scans par spectre, réalisés à température ambiante (blanc : air, 64 scans), avec une résolution nominale de 2  $\text{cm}^{-1}$ , une vitesse de scan de 0,2  $\text{cm/s}$  et une forte apodisation. Le système disposait d'une source MR (8.000-30)  $\text{cm}^{-1}$  et d'un détecteur MIR TGS (15.000-370)  $\text{cm}^{-1}$ . Le signal du bruit de fond a été soustrait de chaque échantillon avec une correction de la ligne de base. Les spectres ont été enregistrés avec le logiciel PerkinElmer Spectrum IR v10.7.2, puis exportés pour être analysés à l'aide du logiciel Spectragryph v1.2.16.1.

### 3.5. Analyses par UPLC-MS

Les analyses par spectrométrie de masse en tandem par chromatographie liquide ultra-performante (UPLC-MS) ont été réalisées en utilisant un système UPLC « Acquity UPLC H-class » (Waters, Milford, USA) couplé à un spectromètre de masse haute résolution « XEVO G2-S QToF » équipé d'une source (Waters, Manchester, UK) d'ionisation électrospray (ESI), grâce à la **plateforme d'analyse haute résolution de biomolécules**. Le système UPLC est constitué d'une pompe quaternaire (Quaternary Solvent Manager, Waters) et d'un

---

échantillonneur automatique (Sample Manager-FTN, Waters) équipé d'une boucle d'injection de 10  $\mu$ L.

Après une dilution (à 1 mg/mL) dans une solution aqueuse d'heptylammonium formate (5 nM), 10  $\mu$ L de  $\lambda$ -COs (sélectionnés de chaque fournisseur) ou de F-Os (sélectionnés de chaque série), ont été injectés dans la colonne C<sub>18</sub> Acquity UPLC BEH (50 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m, waters), puis chauffés à 45°C. Une élution par gradient a été réalisée par un solvant A (5 nM heptylammonium dans H<sub>2</sub>O, 0,0238% (v/v) acide formique, pH = 4,0) et un solvant B (5 nM heptylammonium dans MeOH/H<sub>2</sub>O (3:1, v/v), 0,0238% (v/v) acide formique, pH = 4,0), comme suit: 0–4 min, 10–50% B; 4–6 min, 50% B; 6–10 min, 50–80% B; 10–15 min, 80% B; 16–27 min, 100% B; 28–34 min, 10% B. La colonne et l'échantillonneur automatique ont été maintenus à +45 °C et +10 °C, respectivement. Les composés élués ont été ionisés avec une polarité négative (ESI<sup>-</sup>) selon les paramètres suivants : voltage capillaire à 0,5 kV, température en source à 120 °C, source offset à 80 V, température du gaz de désolvatation à 500 °C, débit du gaz de cône à 50 L/h et le débit de désolvatation du gaz à 800 L/h.

Les analyses MS et MS/MS ont été réalisées avec les approches MS<sup>E</sup> ou MS/MS fast DDA (fast data dependent acquisition) (Waters, Manchester, UK) selon un mode centroïde avec un temps de scan de 0,25 sec/scan. La MS<sup>E</sup> consiste en une acquisition sans énergie de collision dans la fonction 1, et donc sans fragmentation conséquente (fonction de faible énergie). Par contre, dans la fonction 2, une énergie de collision est générée afin de former les ions fragments (fonction de haute énergie). Un logiciel d'algorithmes (MassLynx 4.2) MS<sup>E</sup> attribue ensuite les spectres d'ions fragmentés à leur pic d'ion précurseur respectif en profilant chaque pic chromatographique et en déterminant leur temps de rétention. Dans le mode MS/MS fastDDA, les ions précurseurs sont sélectionnés lorsque leurs intensités atteignent 50.000 a.u./s, pendant 5 sec ou bien jusqu'à ce que leurs intensités soient inférieures à 1.000 a.u./s et une énergie de collision progressive pour générer des ions fragmentés. La fonction 2 de la MS<sup>E</sup> et la MS/MS fast DDA ont été réalisées avec une énergie de collision progressive de 15–60 eV. La Leucine Enkephalin (M = 555,62 Da, 1 ng/ $\mu$ L) a été utilisée pour corriger les décalages de masses, et le spectromètre de masse a été calibré avant les analyses en utilisant une solution de sodium formate (0,5 mM).

### 3.6. Analyses par RMN

Les expériences réalisées consistaient à de la résonance magnétique nucléaire (RMN) du  $^1\text{H}$  (64 scans, 10 min), réalisées uniquement sur des  $\lambda$ -COs sélectionnés de chaque fournisseur de  $\lambda$ -CAR natif, et cela en **collaboration avec le laboratoire CIC biomaGUNE (San Sebastien, Espagne)**. Brièvement, les poudres des  $\lambda$ -COs sélectionnés ont été dissoutes dans une solution de  $\text{D}_2\text{O}$  à une concentration de 20 mg/mL. Les spectres RMN ont été enregistrés en utilisant un spectromètre Bruker AVANCE III 500 MHz à température ambiante.

## 4. Evaluation des activités biologiques

### 4.1. Mesure de l'activité anti-coagulante par coagulométrie

L'activité anticoagulante a été évaluée uniquement sur le fucoïdane natif et les F-Os sélectionnés de chaque série (concernant les  $\lambda$ -CARs/COs, elle a déjà été réalisée dans une publication de notre équipe de Groult *et al.* 2019 [48]). Les tests réalisés sont le temps de thrombine (TT) et le temps de céphaline active (APTT). Ils ont été réalisés grâce aux instructions du fournisseur en utilisant un coagulomètre Start 4 et des kits de la marque Stago Diagnostica (France).

Il s'agit de tests chronométriques dans lesquels le mouvement d'une bille magnétique dans une solution de plasma humain est évalué. Une fois que le plasma a coagulé, cela induit l'arrêt total du mouvement de la bille. Ainsi, le temps de mesure donné, représente le temps que la bille a mis pour s'arrêter de bouger.

Pour réaliser ces tests, tous les réactifs et échantillons ont tout d'abord été incubés à 37°C pendant 30 min. Par la suite, dans une barrette 4 puits, une bille magnétique a été déposée dans chacun des puits. Pour les deux tests, 10  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ ont été déposés dans le premier puit, et 10  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon dilué dans de l'eau milliQ à 1 mg/mL ont été ajoutés en triplicats, suivi de l'ajout de 90  $\mu\text{L}$  de plasma humain (Stago, France) dans chaque puit. Pour le test TT, la barrette a été incubée à 37°C pendant une minute avant l'addition de 100  $\mu\text{L}$  de réactif TT et le déclenchement de la mesure de coagulation du plasma. En revanche, pour le test APTT, 100  $\mu\text{L}$  de réactif APTT ont été ajoutés au mélange plasma et échantillon, suivi d'une incubation à 37°C pendant 3 min, et puis de l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  (25 mM) avant de déclencher la mesure du temps de coagulation du plasma.

---

## 4.2. Mesure de l'inhibition de l'activité de l'HPSE par un test enzymatique basé sur le FRET

L'activité inhibitrice de l'HPSE et les concentrations inhibitrices médianes ( $IC_{50}$ ) ont été déterminées par un test enzymatique basé sur le principe de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Dans ce test, l'enzyme recombinante humaine HPSE1 (CR&D Systems, Minneapolis, MN, USA), son substrat l'héparane sulfate marqué avec de la biotine et du cryptate  $Eu^{3+}$  (Cisbio Assay, Codolet, France) et la streptavidine (Cisbio Assay, Codolet, France) sont nécessaires. Lors de l'excitation à 337 nm, il y a transfert de résonance de fluorescence entre le substrat marqué et la streptavidine, et une émission de fluorescence à 665 nm. L'ajout de L'HPSE1, permet d'hydrolyser le substrat, entraînant une perte de transfert d'énergie et donc une réduction des émissions à 665 nm. La réaction enzymatique a été réalisée dans des plaques blanches à 96 puits (Corning® # 3693, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Pour réaliser ce test, 15  $\mu$ L de  $\lambda$ -CARs natifs,  $\lambda$ -COs,  $\kappa$ -COs,  $\iota$ -COs, (dilués à 10  $\mu$ g/mL pour le suivi de l'activité et entre 0,1–5000  $\mu$ g/mL pour le calcul des  $IC_{50}$ ), fucoïdane natif, ou de F-Os (dilués à 10  $\mu$ g/mL pour le suivi de l'activité), ont été ajoutés dans les puits de la plaque, suivis de 15  $\mu$ L de la solution enzymatique HPSE1 (diluée à 400 ng/mL dans un tampon Tris-HCl pH 7,5 ; 0,15M NaCl et 0,1% CHAPS). La réaction enzymatique a été initiée après une préincubation pendant 10 min à 37 °C, en ajoutant 30  $\mu$ L de la solution de Biotine-HS-Eu(K) (diluée à 4,4 ng/ $\mu$ L dans un tampon d'acétate de sodium 0,2M ; pH 4,5), et la plaque a été incubée à 37 °C pendant 15 min. Enfin, 20  $\mu$ L de la solution de streptavidine-XL665 (diluée à 10 ng/ $\mu$ L dans un tampon  $NaPO_4$  0,1M à pH = 7,7 ; 0,8M KF; 0,1% BSA) a été ajoutée pour permettre la détection. La fluorescence a été mesurée après 5 min à  $\lambda_{em1} = 620$  nm et  $\lambda_{em2} = 665$  nm, après 60  $\mu$ s d'excitation à  $\lambda_{ex} = 337$  nm.

L'inhibition de l'activité anti-HPSE a été calculée en utilisant les formules de l'**Équation 5**. F665 et F620 correspondent aux intensités de fluorescence mesurées, respectivement, à 665 nm et 620 nm.

**Équation 5.** Formules de calcul de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE. **Ec** : échantillon. **Max** : maximal.

$$\text{Substrat hydrolysé Max (\%)} = 1 - \frac{(\text{F665}/\text{F620}) \text{ Hydrolyse Max}}{(\text{F665}/\text{F620}) \text{ Hydrolyse Nulle}} \times 100$$

$$\text{Substrat hydrolysé Ec (\%)} = 1 - \frac{(\text{F665}/\text{F620}) \text{ Ec}}{(\text{F665}/\text{F620}) \text{ Hydrolyse Nulle}} \times 100$$

$$\text{Inhibition relative (\%)} = 1 - \frac{\% \text{ Substrat Hydrolyse Ec}}{\% \text{ Substrat Hydrolyse Max}} \times 100$$

Cette évaluation de l'activité anti-HPSE a été complétée par une étude d'amarrage moléculaire « docking » uniquement sur les CARs, en utilisant le package GOLD 2022.3.0. Cela a été réalisé en **collaboration avec le Collège des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Fédérale de Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina 56304-205, PE, Brésil.**

### 4.3. Evaluation des activités anti-cancéreuses

#### 4.3.1. Culture cellulaire

Trois lignées cellulaires (ATCC, France Office, Molsheim, France) ont été utilisées, une lignée cellulaire du carcinome hépatique humain Huh7, une lignée cellulaire du TNBC MDA-MB-231 et la lignée cellulaire embryonnaire de rein humain HEK 293. Elles ont été cultivées dans un milieu DMEM (4,5 g/L de glucose, sauf pour la lignée Huh7, qui elle, a été cultivée dans du milieu à 1 g/L de glucose) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, France), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Gibco, Thermo-Fisher Scientific, France), et en présence de 1% d'un cocktail d'antibiotiques composé de pénicilline et de streptomycine (Gibco, Thermo-Fisher Scientific, France). Les lignées cellulaires ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et ont été exemptées de mycoplasmes par un traitement approprié (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit ; Lonza, France).

Les cellules ont été cultivées et amplifiées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> et sont repiquées une fois arrivées à confluence deux fois par semaine. Le décollement des cellules est réalisé par

l'utilisation d'une solution de trypsine-EDTA 1X (59418C, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Le comptage des cellules de toutes les lignées étudiées a été réalisé à l'aide d'un compteur cellulaire automatique Cellometer (Nexcelom, Biosciences, France) et du bleu de trypan (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) permettant de différencier les cellules vivantes (blanches) des cellules mortes (bleues).

#### 4.3.2. Evaluation de l'effet sur la viabilité cellulaire

Le principe de ce test cellulaire repose sur une coloration colorimétrique reflétant l'activité métabolique cellulaire mitochondriale. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium (MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), qui, en contact avec des cellules vivantes actives pendant trois heures à 37 °C, va être réduit en formazan, par la succinate déshydrogénase mitochondriale. Cette réaction résulte en la formation d'un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de ce précipité sera proportionnelle à la quantité de cellules vivantes métaboliquement actives. Ensuite, les précipités de formazan violets sont dissous dans une solution de DMSO 100% et la densité optique (DO) est mesurée à 570 nm.

Pour ce faire, les cellules MDA-MB-231 ou HEK293, ont été placées dans des plaques 96 puits à une concentration de 10 000 cellules/puit (200µL) dans un milieu DMEM (complet) pour adhésion durant 24h à 37°C. Sur ces deux lignées, le test a été réalisé avec le fucoïdane natif ainsi qu'avec les différentes formulations de F-Os de chaque série, tous testés à 100 µg/mL et pour une durée de 24h de contact avec les cellules. Après 24 h d'incubation en présence des candidats, 25 µL de la solution de MTT sont ajoutés (solution mère de 5mg/mL diluée dans du PBS stérile) par puits pour ensuite replacer la plaque à l'incubateur pendant 3h. Par la suite, les surnageants sont aspirés et 200 µL de DMSO sont placés dans les puits afin de solubiliser les cristaux de formazan. La plaque est analysée à l'aide d'un lecteur multiplaques par lecture de la DO à 570 nm.

---

Le calcul du pourcentage de viabilité cellulaire a été effectué en suivant l'équation ci-dessous :

**Équation 6.** Formule de calcul de la viabilité cellulaire. **Ec** : échantillon.

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{DO Ec}}{\text{DO contrôle (non traité)}} \times 100$$

#### 4.3.3. Evaluation de l'activité anti-migratoire

##### 4.3.3.1. Sur des cellules d'hépatocarcinome humain (lignée Huh7)

Sur la lignée cellulaire Huh7, l'activité anti-migratoire des  $\lambda$ -COs sélectionnés de chaque marque a été testée dans des chambres de migration cellulaire BioCoat (Corning, Amsterdam, The Netherlands). Les inserts de ces chambres ont été recouverts de fibronectine (100  $\mu\text{g/mL}$ ; Corning, Amsterdam, The Netherlands). Un nombre de  $2,5 \times 10^5$  de cellules Huh7 a été resuspendu dans le milieu de culture DMEM à faible glucose sans SVF (Invitrogen, Fisher Scientific Illkirch, France). Les cellules ont ensuite été déposées dans la chambre supérieure. Du milieu complet avec 10% de sérum bovin fœtal pour « les cellules non traitées » ou du milieu complet contenant 100  $\mu\text{g/mL}$  de  $\lambda$ -COs sélectionnés/contrôles a été déposé dans la chambre inférieure. Après 24h, les cellules ayant migré à travers les pores des membranes des inserts ont été colorées pendant 30 min avec une solution de cristal violet à 1% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), puis comptées manuellement par deux observateurs différents qui ont réalisé l'analyse des données. Ces expériences ont été réalisées en **collaboration avec le laboratoire LVTS de l'université de Paris 13 (Inserm U1148) (Groupe Biothérapies et Glycoconjugués)**.

##### 4.3.3.2. Sur des cellules du TNBC (lignée MDA-MB-231)

Pour étudier les effets des formulations de F-Os générées, sur la migration de la lignée MDA-MB-231, nous avons utilisé des plaques 96 puits spécifiques (Oris™ cell migration assay fibronectin coated-Platypus teubio), contenant des fonds de puits « revêtus » avec de la fibronectine.

Le principe de ce test repose sur l'utilisation de barrières « stoppeuses » d'ensemencement cellulaire Oris™ fabriqués à partir d'une silicone de qualité médicale pour limiter cet ensemencement aux régions annulaires externes des puits. Le retrait des barrières

révèle une zone centrale nonensemencée de 2 mm de diamètre, qui sera la zone de détection dans laquelle les cellules ensemencées pourront ensuite migrer, et être suivies par microscopie.

Les cellules ont été ensemencées dans les plaques de migration à une concentration de 100 000 cellules/puits (150  $\mu$ L). Après 24h d'adhésion, le milieu de culture épuisé a été remplacé par les différentes solutions correspondant aux contrôles ou aux FOs, dilués dans du milieu de culture avec 1% de SVF. Six candidats de F-Os ont été sélectionnés de chaque série (0,5 et 0,15), en se basant sur les résultats de viabilité cellulaire selon des doses (Cf= 25  $\mu$ g/mL et 100  $\mu$ g/mL pour les F-Os de la série 0,5 et 0,15, respectivement) non toxiques pour les cellules. L'effet anti-migratoire des candidats a été comparé avec celui du fucoïdane natif (Cf= 100  $\mu$ g/mL).

En plus du contrôle non traité (cellules dans le milieu de culture avec du PBS), des molécules de référence spécifiquement impliquées dans l'inhibition de la migration ou dans l'inhibition de l'activité HPSE ont été utilisées afin de relier les effets des OS à un mécanisme d'action (**Tableau 8**).

**Tableau 8.** Conditions des contrôles de migration sur les cellules MDA-MB-231.

Contrôle	Référence	Rôle	Dose ( $\mu$ g/mL)
Suramine	Suramin sodium salt, Sigma-Aldrich	Inhibiteur de l'activité enzymatique de l'HPSE [61,63,261,262]	20 $\mu$ M
HBPM	Dépolymérisation radicalaire au H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : BCBS-LIENSs UMR 7266 M <sub>n</sub> : 3,6 kDa DS : 38,52 %	Inhibiteur de l'HPSE [63,65,263,264]	100 $\mu$ g/mL
Batimastat	Tocris Bioscience No.29.611	Inhibiteur de la migration cellulaire [265–267]	10 $\mu$ M

Après l'ajout des solutions définissant les contrôles ou celles des candidats, les barrières des microplaques ont été retirées pour permettre au processus de migration de se réaliser. Ce suivi a été mené au cours d'expériences « live cell » à l'aide du microscope Zeiss permettant

de suivre en temps réel le déplacement des cellules. La plaque a été placée à 37°C dans l'enceinte thermorégulée du microscope conditionné à 5% de CO<sub>2</sub> pour une durée de 48h. Les images ont été analysées et la surface de migration a été quantifiée en utilisant le logiciel Fiji.

Le calcul du pourcentage d'inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231 par les formulations de F-Os de chaque série, a été réalisé selon l'équation suivante :

**Équation 7.** Formule de calcul de la migration cellulaire. **Ec** : échantillon.

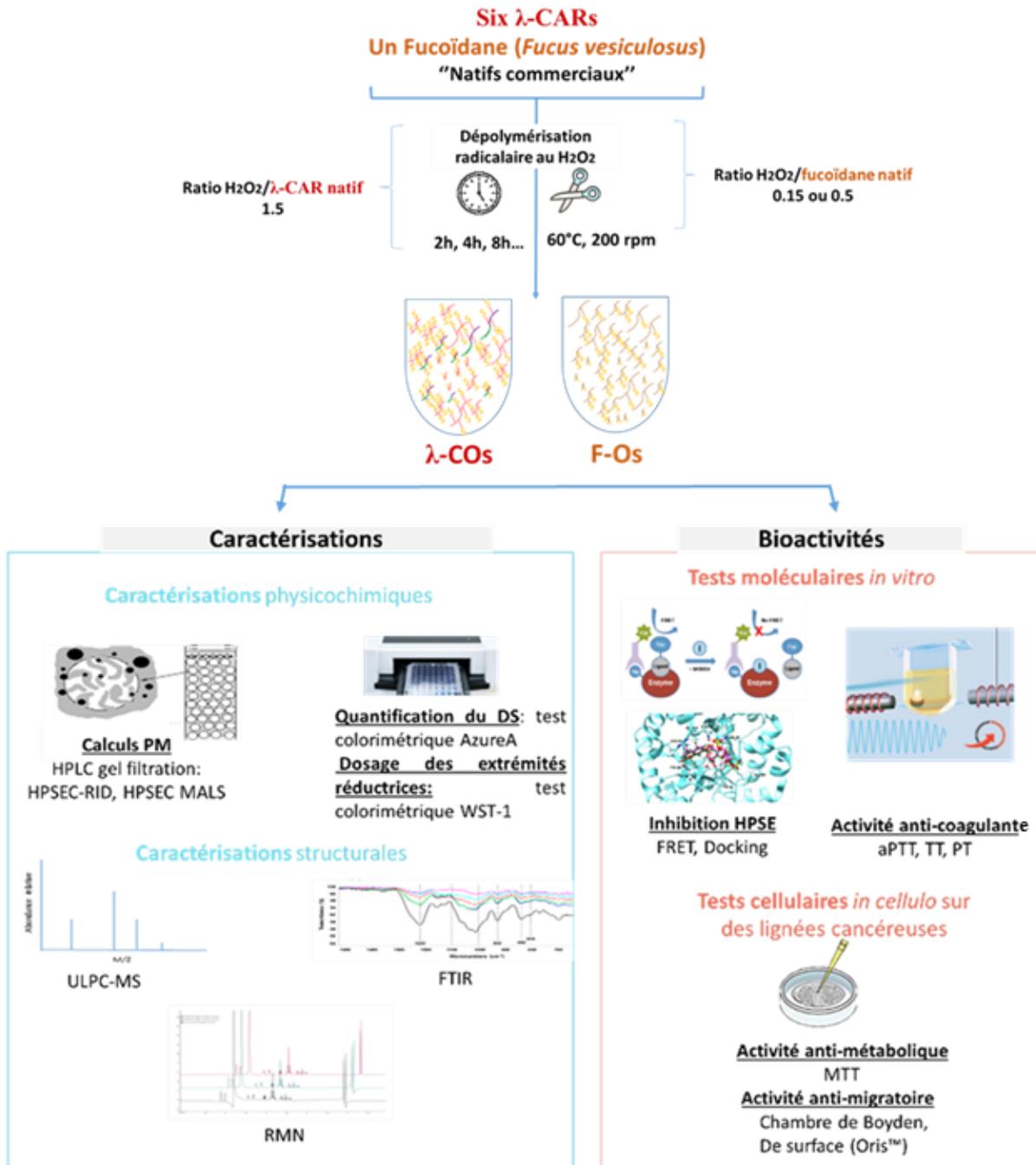
$$\text{Migration cellulaire (\%)} = \frac{\% \text{ Ec}}{\% \text{ contrôle (non traité)}} \times 100$$

## 5. Analyses statistiques

Afin d'analyser la corrélation entre l'activité anti-HPSE, le M<sub>n</sub> et le DS des λ-COs, différents tests statistiques ont été utilisés (régression linéaire à un facteur, modèles de covariance de Pearson et modèle de corrélation à deux facteurs par la méthode des moindres carrés). Une analyse en composantes principales (PCA) a été réalisée grâce au logiciel Origin (r) pour étudier la multivariance des candidats λ-COs impliquant les facteurs M<sub>n</sub>, DS, %HPSE, % glucose (Glc), % migration, et les % types de CARs.

La significativité des effets biologiques des candidats a été évaluée en utilisant le test one-way Anova (pour les expériences de MTT et de migration sur les cellules Huh7), et le two-way Anova (pour les expériences de migration sur les cellules MDA-MB-231), grâce au logiciel GraphPad Prism : \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01 ; \*\*\*, p < 0,001. Les résultats sont représentés par les moyennes (± SEM = standard deviation of mean) de trois expériences indépendantes (n=1 par condition de traitement pour trois plaques N=3) pour les expériences de migration sur les cellules Huh7, et d'une expérience (n=4 par condition de traitement pour une plaque N=1) pour les expériences de migration sur les cellules MDA-MB-231.

## 6. Résumé graphique



**Figure 21.** Résumé graphique de la démarche expérimentale.

## **Partie 3 : Résultats et discussions**



## **Chapitre 1 : Conception et optimisation d'oligosaccharides de $\lambda$ -carraghénanes à visée anti-cancéreuse**

### **Article 1- publié**

#### **A Screening Approach to Assess the Impact of Various Commercial Sources of Crude Marine $\lambda$ -Carrageenan on the Production of Oligosaccharides with Anti-heparanase and Anti-migratory activities**

**Manseur C.**, Groult, H, Porta, M., Bodet, P-E Mersni-Achour, R., Petit, R., Ali-Moussa S., Musnier, B., Le Cerf D., Varacavoudin T., Haddad O., Sutton A., Leal, Cíntia Emi Yanaguibashi, Alencar-Filho, Edilson Beserra, Piot J-M., Bridiau, N., Maugard, T., Fruitier-Arnaudin I. *Mar. Drugs* 2023, 21, 295. <https://doi.org/10.3390/md21050295>.

IF<sub>2023</sub> = 5,4

---

## 1. Introduction

À travers de nombreuses études, les oligosaccharides de  $\lambda$ -carraghénanes ( $\lambda$ -COs) ont montré des effets prometteurs par leur implication dans différents processus tels que la réponse immune [47,112,213,214], l'interaction avec des facteurs de croissance [42], ou encore la perturbation du métabolisme des cellules endothéliales au sein de la MEC [168,216,217]. Ces oligomères ont notamment été rapportés pour leur capacité anti-angiogénique [72], et leur pouvoir à inhiber l'invasion et la migration de cellules cancéreuses [48,58]. Parmi leurs mécanismes d'action, démontrés par de précédents travaux dont ceux de notre équipe, les  $\lambda$ -COs sont capables de réguler l'HPSE [48,58,72,253], une enzyme surexprimée dans différents cancers, et décrite pour sa forte implication dans la progression tumorale [65]. Il s'agit de la seule endoglycosidase capable de cliver les chaînes des HS, qui sont des composés importants de la matrice extracellulaire (MEC) et notamment dans le microenvironnement tumoral (MET) [65].

Néanmoins, malgré les nombreux efforts fournis, la valorisation clinique de ces  $\lambda$ -COs, préparés par des approches de dépolymérisation d'un PS natif d'origine naturelle, fait face à de sérieux défis, notamment celui lié à leur hétérogénéité [28]. En effet, ce sont des formulations à disparité variable en termes de  $M_n$ , de DS, et de composition saccharidique. Cette hétérogénéité est liée à de nombreux facteurs, comme par exemple la méthode de dépolymérisation appliquée, ou encore à des variations structurales déjà présentes dans le PS de départ. En plus des différents facteurs environnementaux pouvant influencer la composition/structure des PS algaux, la production des  $\lambda$ -CARs par certaines espèces d'algues rouges est également liée à leur cycle de reproduction. Comme avancé dans le chapitre introductif, l'extraction et le semi-raffinage industriel ne discriminent pas les états reproductifs de l'algue. Ce point aboutit à un mélange de plusieurs types de CARs extraits dans les produits commerciaux estampillés «  $\lambda$ -CARs », faisant de ces PS un type bien représentatif des problèmes d'hétérogénéité de la matière première.

Pour analyser cette problématique à laquelle font face les OS de manière générale et plus particulièrement les  $\lambda$ -COs (*défi 1-Standardisation*), les travaux de cet article visaient principalement à évaluer **l'influence des variations présentes dans les  $\lambda$ -CARs natifs issus de différents fournisseurs commerciaux, sur la production de  $\lambda$ -COs à fonctionnalité anti-tumorale.**

Pour y répondre, 6  $\lambda$ -CARs natifs provenant de différents fournisseurs ont été comparés à plusieurs échelles. Tout d'abord, une caractérisation de leurs PM, une analyse élémentaire incluant leur DS, et une analyse structurale par FTIR ont été effectuées. Une dépolymérisation radicalaire par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  a ensuite été appliquée sur chacun des PS natifs, et des prélèvements ont été réalisés au cours du temps, jusqu'à 96h. Les  $\lambda$ -COs obtenus au cours de la cinétique, ont été caractérisés en termes de PM, de DS, et de concentration en sucres réducteurs (voir partie **Partie 2 : Matériels et méthodes**). Un suivi de l'activité anti-HPSE à une seule concentration a ensuite été réalisé sur l'ensemble de la bibliothèque des candidats obtenus. De plus, six  $\lambda$ -COs (produits par un fournisseur différent) de PM et DS proches ont été sélectionnés dans chaque série afin de calculer et de comparer les  $\text{IC}_{50}$  de leurs activités anti-HPSE. Pour compléter cette étude, une caractérisation structurale des six candidats a été effectuée par MS et RMN.

Ces six candidats ont des PM (1,1-1,9 kDa) et DS (12-16 %) qui assurent une balance adéquate entre une activité anti-HPSE effective et une faible activité anti-coagulante, comme démontré dans des travaux antérieurs [48,58]. Pour finir, nous avons donc testés leurs activités anti-migratoire dans la lignée cellulaire du carcinome hépatique humain Huh7, décrite pour surexprimer l'HPSE [268]. Afin de mieux comprendre si les effets anti-HPSE et anti-migratoires entre les  $\lambda$ -COs dépendent des légères variations du  $M_n$ , du DS, ou s'ils sont « marque-dépendant », des analyses statistiques multivariées ont été réalisées.

## 2. Résultats et discussions

### 2.1. Estimation des grandeurs caractéristiques de base et caractérisation structurale des $\lambda$ -CARs natifs

La caractérisation par HPSEC-MALS des 6  $\lambda$ -CARs natifs provenant des différentes marques a montré des différences **remarquables entre eux, en termes de  $M_n$  et  $M_w$** , pouvant aller respectivement, de 597 et 964 kDa pour le  $\lambda$ -CAR\_3 jusqu'à 215 et 762 kDa pour le  $\lambda$ -CAR\_1. Grâce à cette même technique, et comme le démontrent les chromatogrammes, **des espèces de bas poids moléculaire (BPM) dans les échantillons des  $\lambda$ -CARs natifs ont été détectées**. Ces espèces étaient plus abondantes dans ceux du  $\lambda$ -CAR\_4, qui présentait déjà deux populations bien distinctes des espèces de plus haut poids moléculaire (HPM).

Les analyses par ICP-MS, ont montré **des différences en termes de DS entre les  $\lambda$ -CARs natifs**. En effet, le  $\lambda$ -CAR\_1,2,5 et \_6 sont les plus sulfatés (26,0%, 27,0%, 28,5%, et 28,9%,

respectivement) que le  $\lambda$ -CAR\_3 et \_4 (21,4% et 21,9%, respectivement). **Des variations dans la composition élémentaire mesurée par ICP-MS ont également été identifiées**, en termes de quantités en fer, magnésium et manganèse.

Enfin, les analyses structurales par FTIR ont révélé la **présence de  $\kappa$ - et de  $\iota$ - CARs dans les 6 échantillons commerciaux de  $\lambda$ -CARs testés.**

Ces premiers résultats de caractérisation structurale sont une première indication :

- De la présence des **différences entre les produits commerciaux vendus en tant que  $\lambda$ -CARs natifs, en termes de  $M_n$ , de DS.**
- **D'une hétérogénéité au sein des échantillons eux même, à travers la présence de différentes familles de CARs ( $\lambda$ -,  $\kappa$ - et  $\iota$ ), et d'espèces de BPM.**

## 2.2. Dépolymérisation des $\lambda$ -CARs natifs pour la production de $\lambda$ -COs

La dépolymérisation des 6  $\lambda$ -CARs natifs a été réalisée par une **voie chimique radicalaire utilisant l' $H_2O_2$**  à 60 °C et avec un ratio de  $H_2O_2/\lambda$ -CARs (m/m) fixé à 1,5. La réaction a induit une **diminution du  $M_n$  en fonction du temps de dépolymérisation**. Les analyses structurales réalisées par HPSEC-DRI ont montré que les  **$M_n$  des  $\lambda$ -COs des marques testées étaient différents jusqu'à 24h de temps de dépolymérisation**, ce qui pourrait s'expliquer par les différences initiales de  $M_n$  entre les  $\lambda$ -CARs natifs. En effet, la réaction la plus rapide était celle du  $\lambda$ -CAR\_1 qui avait le  $M_n$  le plus faible (215 kDa), tandis que la plus lente était dans le cas du  $\lambda$ -CAR\_3 qui avait le  $M_n$  le plus élevé (597 kDa). Cette cinétique n'est pas valable pour tous les  $\lambda$ -CARs, suggérant l'influence d'autres paramètres tels que la conformation structurale, qui pourrait leur procurer une résistance à la dépolymérisation. En revanche, **après 24h de dépolymérisation, les  $M_n$  des  $\lambda$ -COs respectifs de chaque marque se rapprochent**, probablement grâce à la génération **de motifs structuraux plus similaires au cours de la réaction**.

En plus de la diminution du  $M_n$  au cours du temps, **la réaction de dépolymérisation a induit également une désulfatation**. Cette dernière reste faible lorsque le  $M_n > 20$  kDa, puis accélère ensuite lorsque le  $M_n$  est en dessous de ce seuil, et pendant que la cinétique de

l'hydrolyse ralentit. Il est possible de justifier ce comportement par la structure tridimensionnelle complexe des  $\lambda$ -CARs natifs, qui limite ainsi l'exposition des groupements sulfates à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  au début de la réaction, ou encore par une résistance liée à une position particulière parmi les 3 groupements sulfates composant théoriquement le  $\lambda$ -CAR, au début de la réaction [48]. Enfin, en comparant les  $\lambda$ -COs obtenus de chaque marque, il a été constaté qu'ils présentaient des **différences importantes en termes de DS à des  $M_n > 10$  kDa**, corrélées aux différences initiales observées chez les  $\lambda$ -CARs natifs. Là encore, les DS ont tendance à se rapprocher entre-eux pour les  $\lambda$ -COs de plus BPM avec la génération de motifs structuraux plus similaires.

Le suivi de la réaction de dépolymérisation a été complété par la mesure des concentrations en sucres réducteurs dans les solutions des différentes formulations obtenues. Il a été constaté que ces **concentrations augmentaient au cours de la dépolymérisation pour les formulations de  $M_n > 10$  kDa**, en raison de la libération des extrémités réductrices au cours du temps. En revanche, de manière surprenante, à des  **$M_n$  en dessous de cette valeur, la concentration en sucres réducteurs a diminué**. Ceci pourrait être dû à de **possibles changements structuraux dans les monosaccharides terminaux**. De plus, la concentration en sucres réducteurs a été plus élevée chez les  $\lambda$ -CAR\_3 et \_4, confirmant les résultats de l'HPSEC-MALS qui suggèrent la présence de produits de BPM dans les mélanges de départ.

Enfin, afin de vérifier la reproductibilité de la méthode de dépolymérisation par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , la réaction a été répétée en utilisant les mêmes temps de dépolymérisation pour un  $\lambda$ -CO sélectionné de chaque marque. Les  $M_n$  obtenus étaient différents entre les deux  $\lambda$ -COs de chaque marque. Cette expérience révèle la nécessité d'utiliser des méthodologies alternatives de production avec des conditions plus contrôlées, notamment en termes de température et d'agitation. Il faut mentionner que la solubilisation des  $\lambda$ -CARs natifs a été réalisée à la limite de leur solubilité (5 mg/mL), ce qui aurait pu engendrer une sorte d'hydrolyse en phase hétérogène. Par conséquent, nous pouvons considérer qu'une bonne reproductibilité des  $\lambda$ -CO produits est possible à la condition de pouvoir effectuer **un suivi en direct de la réaction de dépolymérisation ( $M_n$ , DS)**, comme déjà réalisé dans le cas de la production industrielle de l'héparine de BPM [159].

Ces résultats indiquent que :

- **Malgré les différences présentes dans les échantillons des  $\lambda$ -CARs natifs en termes de  $M_n$  de DS, la réaction de dépolymérisation permet une sorte d'homogénéisation de ces deux paramètres chez les  $\lambda$ -COs de BPM (<10 kDa).**
- **La reproductibilité de la dépolymérisation n'est pas satisfaisante mais peut être améliorée.**

### 2.3. Etude de l'inhibition de l'HPSE par les $\lambda$ -COs

Après la caractérisation macromoléculaire de toutes les formulations de  $\lambda$ -COs générées à partir des 6  $\lambda$ -CARs natifs de chaque marque, un suivi de l'activité de notre enzyme d'intérêt, l'HPSE, a été réalisé en présence des  $\lambda$ -COs préparés à une concentration permettant de couvrir l'évolution des activités. Les résultats ont montré une **baisse de l'activité enzymatique corrélée à une diminution du  $M_n$  et du DS**, comme précédemment démontré par notre équipe [48].

Les deux variables  $\ln(M_n)$  et DS ont ainsi montré indépendamment, une corrélation linéaire de Pearson quasiment complète avec l'activité anti-HPSE (0,962 et 0,929, respectivement). L'analyse multiple de régression linéaire par la méthode des moindres carrés incluant les deux variables a confirmé qu'elle pouvait expliquer plus de 97,6 % de la variance du système. Comme la méthode radicalaire désulfate au cours de la dépolymérisation, il est difficile d'établir une conclusion claire sur l'importance du  $M_n$  par rapport au DS dans ce suivi d'activité anti-HPSE. En ce sens, une dépolymérisation enzymatique qui préserve les groupements sulfates ou l'établissement de nouvelles séries à partir de  $\lambda$ -COs de  $M_n$  définis avec différents grades de resulfatation/désulfatation contrôlés pourraient permettre de lever cette interrogation.

Les mêmes analyses statistiques de corrélation linéaire de Pearson à un facteur ont également été répétées, mais cette fois-ci en séparant les  $\lambda$ -COs selon le fournisseur d'origine. Ces analyses ont révélé des différences entre les séries de  $\lambda$ -COs des différentes marques dans les coefficients de linéarité des activités anti-HPSE en fonction du  $\ln(M_n)$  et sur DS. Cela suggère une influence des variations initiales présentes dans les échantillons de  $\lambda$ -CARs natifs. Pour appuyer cette hypothèse, six candidats  $\lambda$ -COs avec un  $M_n$  et un DS proches et issus chacun d'un fournisseur différent ont été sélectionnés, puis leurs  $IC_{50}$  vis-à-vis de l'HPSE ont été

calculées. Des changements importants entre les candidats ont été observés, difficilement imputables aux variations mineures des  $M_n$  et DS entre-eux. Encore plus marquant, les analyses statistiques de corrélation effectuées entre les  $IC_{50}$  obtenues pour les  $\lambda$ -CARs natifs de chaque fournisseur et le  $M_n$  ou le DS n'ont pas été significatives (p-value jusqu'à 0,3). Ces résultats viennent confirmer que si évidemment, le  $M_n$  et le DS sont des paramètres clés pour l'activité anti-HPSE, il existe une variation « marque-dépendante ».

En marge de notre questionnement principal lié à l'impact de la matière première utilisée pour la génération de  $\lambda$ -COs anti-HPSE, nous souhaitons replacer et discuter dans ce paragraphe du potentiel de ces  $\lambda$ -COs en comparaison avec d'autres inhibiteurs de nature saccharidique trouvé dans la littérature, en particulier l'héparine (inhibiteur de référence de l'HPSE). Bien que nous ayons déjà argumenté que l'utilisation des PS natifs est limitée, comparer leur  $IC_{50}$  vis-à-vis de l'HPSE reste informatif. En effet, les  $IC_{50}$  des  $\lambda$ -CARs natifs étudiés se positionnent dans la même gamme de concentrations que celle de l'héparine native [58], à savoir, 0,3-0,9  $\mu\text{g/mL}$  vs 0,63  $\mu\text{g/mL}$ . Les premières études de la littérature comparant l'activité anti-HPSE du  $\lambda$ -CAR natif et celle de l'héparine native valident également ce résultat d' $IC_{50}$  proches, bien que ces valeurs ont été obtenues à partir de l'application de tests différents [22,24]. Parmi les  $\lambda$ -COs sélectionnés de chaque marque, le  $\lambda$ -CO\_5 (dep2) a l' $IC_{50}$  la plus proche de celle d'une héparine de BPM, calculée dans nos précédentes études [58], à savoir, 7,0  $\mu\text{g/mL}$  contre 1,02  $\mu\text{g/mL}$ . Il faut néanmoins prendre ces résultats avec précaution car les caractéristiques moléculaires de base ( $M_n$  et DS) de l'héparine de BPM ( $M_n$  5,1 kDa et DS 28%) par rapport à celles du  $\lambda$ -CO\_5 (dep2) ( $M_n$  2,5 kDa et DS 24,1%) sont légèrement différentes.

Ces résultats indiquent que :

- **Pour chaque marque, la baisse de l'activité enzymatique est complètement corrélée à une diminution du  $M_n$  et du DS.**
- **En plus du  $M_n$  et du DS, des variations structurales présentes dans les échantillons des 6  $\lambda$ -CARs natifs pourraient expliquer les différences d'activité anti-HPSE des  $\lambda$ -COs produits.**

## 2.4. Caractérisation structurale par UHPLC-MS et RMN des $\lambda$ -COs sélectionnés

### 2.4.1. Analyses par UHPLC-MS

Pour élucider les différences de compositions dans les formulations de  $\lambda$ -COs issus de marques différentes qui sont possiblement à l'origine des variations de l'activité anti-HPSE, des analyses structurales par MS ont été effectuées. Sur les six candidats  $\lambda$ -COs sélectionnés, elles ont révélé des différences quantitatives sur 35 marqueurs représentatifs sélectionnés dans les spectres. Parmi ces marqueurs, des séquences typiques du type  $\lambda$  étaient présentes, incluant: Gal(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-Gal, Gal(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-GalGal(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Gal(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-Gal-Gal-(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ou Gal(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-Gal. La présence des sulfates dans ces marqueurs confirme que la désulfatation n'est pas complète durant la réaction de dépolymérisation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

D'ailleurs, de manière surprenante quelques séquences hautement sulfatées (Gal(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-Gal-Gal-(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>4</sub>) étaient également présentes. Les séquences galactopyranoses détectées étaient limitées à un DP3, ce qui pourrait être dû à plusieurs raisons : la réaction de dépolymérisation, les conditions de l'analyse MS (perte d'ionisation d'espèces à de plus hauts DP) ou encore une fragmentation en source en raison de l'instabilité des composés. La présence d'autres types de CARs, déjà révélée par les analyses FTIR des  $\lambda$ -CARs natifs, a été confirmée, par la détection des marqueurs contenant des ponts anhydres (Gal(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-Gal-AnGal and Gal(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-Gal-AnGal-(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Ces analyses ont également montré la présence d'espèces plus complexes (hautement oxydées, lactones, polyols, etc), certainement en raison de la réactivité de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce dernier a d'ailleurs déjà été décrit pour induire des modifications de la structure initiale du sucre. Ces modifications peuvent altérer les extrémités réductrices des sucres, ce qui expliquerait la baisse observée dans le dosage WST-1 réalisé précédemment.

### 2.4.2. Analyses par RMN

Afin de valider les hypothèses précédentes, et essayer de détecter des différences plus qualitatives, des analyses RMN  $^1\text{H}$  ont également été réalisées sur les six  $\lambda$ -COs sélectionnés de chaque fournisseur.

Les résultats ont indiqué la présence de Glc (25%) dans les échantillons de  $\lambda$ -CO\_3 et \_4, souvent utilisé dans les processus de fabrication afin de contrôler la viscosité finale des mélanges. La détection de celui-ci justifie d'un côté les plus faibles DS moyens dans les  $\lambda$ -CAR\_3 et \_4 natifs par rapport aux autres, et d'un autre côté la présence des hautes intensités de pics additionnels d'espèces de BPM détectés par DRI dans leurs chromatogrammes. Également, cela confirme les observations faites lors de la quantification des sucres réducteurs qui avaient montré une concentration élevée et inattendue au début de la dépolymérisation de ces deux  $\lambda$ -CARs natifs. Il est difficile de connaître la nature du Glc introduite (simple ou en sucre complexe).

Par ailleurs, à travers ces analyses nous avons encore une fois confirmé la présence des types  $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs dans les échantillons de  $\lambda$ -CARs natifs commerciaux. La semi-quantification de ces différents types a révélé les résultats suivants :

- Le  $\lambda$ -CO\_5 contient la plus forte proportion en type  $\lambda$  (23%), tandis que le  $\lambda$ -CO\_4 et \_6 contiennent les plus faibles proportions (17%).
- Le  $\lambda$ -CO\_2 et \_6, étaient les plus abondants en  $\nu$ -CAR (35 et 33%, respectivement), dont la structure se rapproche du  $\lambda$ -CAR.
- Le  $\iota$ -CAR était plus abondant dans la formulation de  $\lambda$ -CO\_4 (24%).
- Le  $\kappa$ -CAR était prédominant dans les échantillons de  $\lambda$ -CO\_1, \_3, \_4 et \_5.

Sur la base de ces résultats, nous avons trouvé important d'évaluer l'impact de ces différentes proportions en types de CARs, et de la proportion en Glc dans les formulations de  $\lambda$ -COs, sur l'activité anti-HPSE. Pour ce faire, une analyse statistique multivariée en composante principale (PCA) a été réalisée, et a indiqué les résultats suivants :

- Intégration complète du  $M_n$  et DS avec l'activité anti-HPSE dans l'axe PC1.
- Parmi les types de CARs, le  $\lambda$ - est le seul à être corrélé avec l'activité anti-HPSE dans les axes (PC2 et PC3) contenant la variance mineure de l'activité de l'HPSE.
- Les types  $\kappa$ - et  $\iota$ - sont inversement corrélés au type  $\lambda$ -, en raison des proportions des formes tétrasporophytes et gamétophytes producteurs de ces types dans l'algue.

- Les résultats montrent que le Glc a été ajouté dans les échantillons de  $\lambda$ -CARs contenant le plus de types de CARs gélifiants ( $\kappa$ - et  $\iota$ - CARs) par rapport aux non gélifiants ( $\nu$ - et  $\lambda$ -).

L'impact des proportions du Glc (dans le cas où il s'agit de Glc simple) et des différents types de CARs dans les échantillons de  $\lambda$ -CARs natifs commerciaux sur l'activité anti-HPSE a été étudié en réalisant des tests supplémentaires avec du Glc, des  $\kappa$ - et de  $\iota$ - COs produits à partir de  $\kappa$ - et de  $\iota$ - CARs natifs commerciaux. Contrairement aux  $\lambda$ -CARs natifs, l'avantages de ces deux types de CARs est qu'ils peuvent être obtenus à un haut degré de pureté à partir d'autres algues rouges. Le test enzymatique réalisé en présence de Glc a montré comme attendu aucune inhibition de l'activité de l'HPSE. Par contre, les résultats avec les sucres algaux ont révélé que si les  $\kappa$ -COs ne présentent aucune activité anti-HPSE, les  $\iota$ -COs purs étaient, eux bien actifs. Néanmoins, ces derniers restent moins efficaces que les formulations « mélanges » de  $\lambda$ -COs. Cela pourrait être dû au fait que les  $\lambda$ - et  $\iota$ - CARs ou leurs dérivés de BPM ont des DS plus élevés que ceux du  $\kappa$ -CAR et  $\kappa$ -COs. Il faut noter que pour entériner ces observations, il serait important d'obtenir et de tester des formulations de  $\lambda$ -COs purs et non en mélange (voir

**Partie 4 : Conclusions générales et perspectives**). Ces résultats ont également été renforcés par des expériences de « docking » en modélisation moléculaire, réalisées en collaboration, avec le **College of Pharmaceutical Sciences (Federal University of Vale do São Francisco, Brésil)**, sur les séquences trisaccharidiques théoriques des différents types de CARs. Les expériences ont montré un score d'interaction plus élevé des séquences trisaccharidiques du  $\lambda$ -CAR et du  $\iota$ -CAR avec le site catalytique de l'HPSE, par rapport à celui du  $\kappa$ -CAR.

De plus, une étude a mis en évidence l'importance du profil de sulfatation des séquences saccharidiques, pour la liaison des HS sur le site catalytique de l'HPSE, le substrat naturel de l'HPSE avec le site catalytique de l'enzyme [233]. Il est donc tout à fait possible de suggérer que la structure de type  $\kappa$ -, et notamment son profil de sulfatation (dont le degré est plus faible que les type  $\lambda$ - et  $\iota$ -) ne privilégie pas une liaison à l'HPSE. L'ensemble de ces expériences confirment que l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE ne serait pas le résultat d'un encombrement stérique, mais plutôt d'une forte affinité avec un/des motifs sulfatés précis présents au sein des structures des types  $\lambda$ - et  $\iota$ -.

Nous souhaitons ici mentionner qu'indirectement, par de nouvelles études structures-fonctions sur les autres types de CARs des algues rouges, ce travail nous a également permis d'aborder le *défi 2- Criblage* utile à la maturation clinique des OS algaux thérapeutiques.

Ces résultats indiquent que :

- **Les caractérisations structurales par UPLC-MS et RMN ont confirmé la présence de différents types de CARs dans les formulations de  $\lambda$ -COs issues de  $\lambda$ -CARs natifs commerciaux, et pour deux d'entre-eux, la présence d'un additif à base de Glucose.**
- **L'activité anti-HPSE est liée principalement au  $M_n$ , au DS, mais pourrait être favorisée également par l'abondance des types  $\lambda$ -,  $\iota$ -, et non pas du type  $\kappa$ -.**
- **Lors des analyses des bioactivités des  $\lambda$ -COs (*in vitro* ou *in cellulo* à venir), il est important de considérer que la structure initiale des types  $\lambda$ - a pu être altérée par la dépolymérisation à l' $H_2O_2$  et la création de nouvelles fonctions chimiques actives (exemples : lactones).**

## 2.5. Activité anti-migratoire des $\lambda$ -COs sur les cellules d'hépatocarcinome de la lignée Huh7

Le but ici était double et se plaçait dans le *défi 3- Compréhension* :

D'une part, il s'agissait de comprendre si les activités anti-HPSE des  $\lambda$ -COs pouvaient être corrélées à des effets régulateurs de la migration chimiotactique de cellules d'hépatocarcinome (Huh7, déjà décrite pour surexprimer l'HPSE [268]) ou bien, s'il présentait des interactions avec d'autres cibles (exemples : facteurs de croissance, chimiokines, etc) [42]. D'autre part si les effets entre les candidats testés diffèrent selon les paramètres physicochimiques et les variabilités dans les compositions du produit d'origine.

D'une manière plus générale, ces expériences nous ont permis également de vérifier si les effets anti-migratoires des  $\lambda$ -COs pouvaient être « contexte pathologique dépendants » en comparant les résultats obtenus avec ceux précédemment publiés sur des cellules d'un autre type de cancer : le TNBC, modélisé par la lignée MDA-MB-231 [48,58].

---

L'expérience a été réalisée sur des  $\lambda$ -COs préalablement sélectionnés sur la base de leurs  $M_n$ , de leur DS et de leur  $IC_{50}$  vis-à-vis de l'HPSE. Un  $\kappa$ - et un  $\iota$ -COs présentant des caractéristiques proches des  $\lambda$ -COs ont également été utilisés pour comparaison. Les résultats sont les suivants :

- Différences de l'activité anti-migratoire entre les  $\lambda$ -COs selon leur origine, avec un meilleur effet du  $\lambda$ -CO\_1 (inhibition toutefois modérée de 26%).
- Les meilleures activités anti-migratoires ont été obtenues avec le  $\kappa$ - et  $\iota$ -COs purs avec 32 et 38% d'inhibition, respectivement.

Une autre analyse statistique PCA a été réalisée dans le but de discriminer les paramètres impliqués dans l'inhibition de la migration des cellules Huh7, révélant les résultats suivants :

- La proportion en type- $\lambda$ , le  $M_n$  et le DS sont bien corrélés avec l' $IC_{50}$  vis-à-vis de l'HPSE (axe PC2) confirmant les analyses précédentes.
- Néanmoins, l'activité anti-migratoire n'est que très faiblement liée à l'activité anti-HPSE (et donc à la proportion en type- $\lambda$ , au  $M_n$  et au DS). En revanche, elle semble être due à la présence d'espèces de type  $\iota$ -, et de type  $\kappa$ - bien que ces dernières aient une activité anti-HPSE beaucoup plus faible.
- Ces résultats révèlent une relation structure-fonction directe, en indiquant qu'une meilleure inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE, ne se traduit pas forcément par une meilleure activité anti-migratoire, probablement dû à une interaction préférentielle des espèces lambda avec d'autres biomolécules dans le mélange complexe qui n'ont pas ou peu d'impact sur le phénotype migratoire.

Sur l'aspect « contexte pathologique dépendant », l'activité modérée de la formulation  $\lambda$ -CO\_1 observée sur la migration des Huh-7 est concordante avec celle obtenue précédemment sur les MDA-MB-231, bien que cette dernière soit plus marquée (60%). Dans cette étude précédente, il a été démontré que l'effet d'inhibition de la migration d'un  $\lambda$ -CO\_1 n'est que partiellement médié par l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE et que d'autres mécanismes sont impliqués, comme la capacité d'interagir avec des facteurs de croissance, la régulation des niveaux d'expression de l'HPSE, et l'implication des MMPs [58]. Au regard des résultats précédents et présents, du fait que le candidat soit une formulation de plusieurs types

de CARs, il est donc possible de conjecturer que **1)** le  $\lambda$ -CO\_1, et en particulier les espèces de type  $\lambda$ - du mélange puissent interagir avec d'autres partenaires biologiques impliqués ou non dans la migration, **2)** les espèces de types  $\kappa$ - et  $\iota$ - sont celles qui sont à l'origine des autres mécanismes d'inhibition de la migration cellulaire, mis en valeur dans notre précédente étude.

Ces résultats indiquent que :

- **L'activité anti-HPSE des formulations de  $\lambda$ -COs testées ne participe que partiellement à leurs activités anti-migratoires dans les cellules Huh7, et d'autres mécanismes sont impliqués, notamment à travers la présence d'espèces de type  $\kappa$ - et  $\iota$ -.**

## **Chapitre 2 : Conception et optimisation d'oligosaccharides de fucoïdanes à visée anti-cancéreuse**

### **Section 1- Oligosaccharides de fucoïdanes inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'héparanase et de la migration**

#### **Article 2- en cours de rédaction**

##### **Structure function insights on fucoidan oligosaccharides with anti-heparanase and anti-migratory activities**

**Manseur C., Saliba J.,** Mersni-Achour R., Colin B., Musnier B., Ali-Moussa S., Bodet P-E., Bridiau N., Le Cerf D., Varacavoudin T., Piot J-M., Maugard T., Groult H\*, Arnaudin I\*. (journal non défini).

---

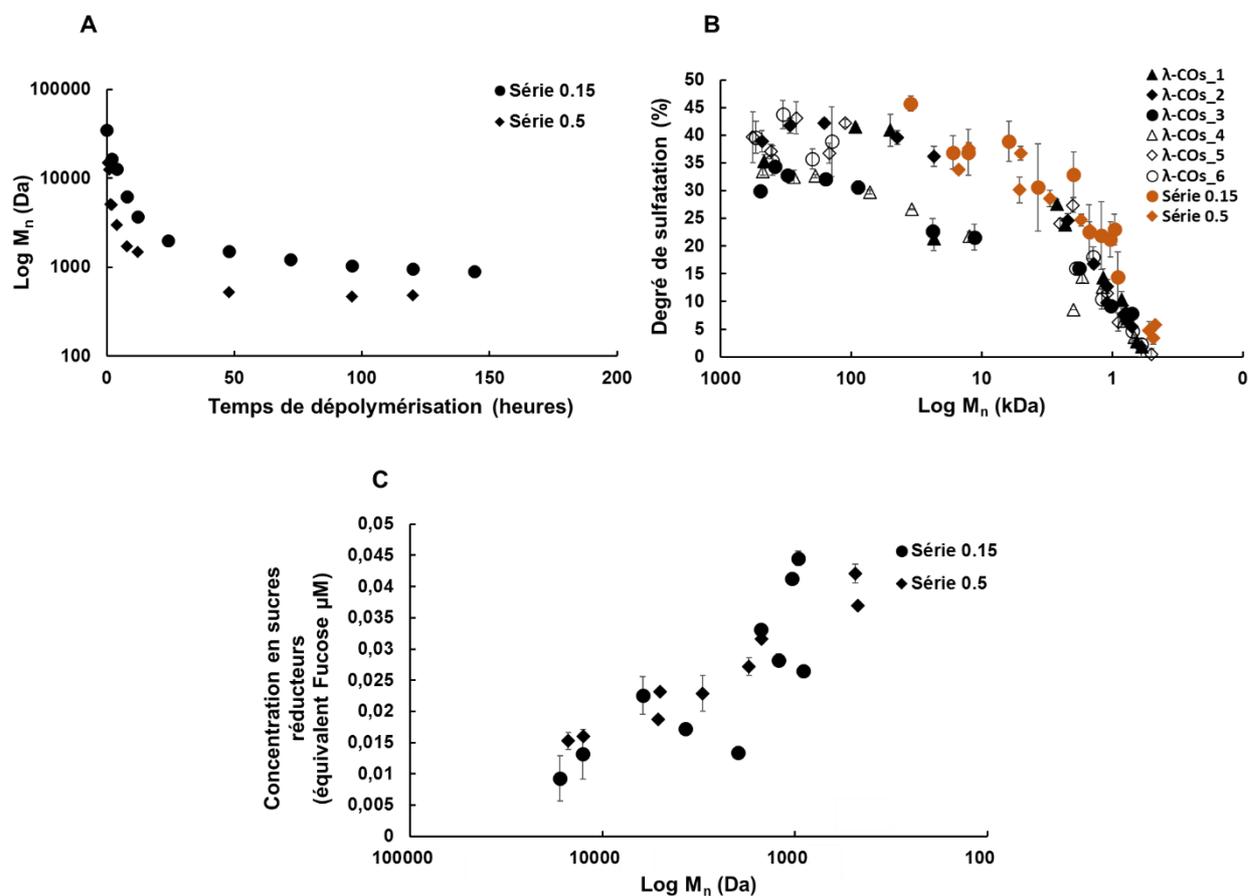
## 1. Introduction

Pour pallier aux limites de la chimiothérapie, l'identification de nouvelles cibles plus spécifiques devient une urgence. De manière intéressante, le MET offre des possibilités, notamment à travers la surexpression de l'HPSE, une enzyme clé surexprimée dans la MEC/MET et impliquée dans de nombreux processus de la progression tumorale, devenant ainsi une cible thérapeutique d'intérêt [63,65]. Dans le cadre de cette investigation, les OS ont émergé comme une classe d'inhibiteurs prometteurs puisque ce sont comme des mimes structuraux du substrat naturel de cette enzyme, les HS. Parmi ces OS, ceux d'origine algale, et en particulier les  $\lambda$ -COs se sont largement démarqués [42,48,58,72,253]. Néanmoins, les F-Os, malgré une littérature très étoffée de leurs potentiels en oncologie, ont été écartés de ces études. Cela nous a motivé à explorer le potentiel de ces F-Os à inhiber l'HPSE puis à réguler le processus de migration de cellules cancéreuses médié en parti par l'HPSE.

Pour ce faire, des dépolymérisations radicalaires par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  d'un fucoïdane natif commercial issu de l'espèce d'algue brune *Fucus vesiculosus*, ont été réalisées en appliquant deux ratio de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Fucoïdane natif différents, 0,15 et 0,5 ; générant ainsi deux séries de F-Os. Dans un premier temps, une estimation des caractéristiques moléculaires de base ( $M_n$ ,  $D$ , DS) du fucoïdane natif et de l'ensemble de « l'oligothèque » de F-Os générés a été réalisée. Une élucidation structurale par FT-IR et par MS a également été effectuée sur des F-Os sélectionnés des deux séries. Par la suite, afin d'identifier des candidats F-Os prometteurs, un criblage des activités biologiques d'intérêt a été effectué *in vitro*. Tout d'abord, il a été important de s'assurer que les F-Os générés présentaient peu ou pas d'activité anti-coagulante, en mesurant leurs effets sur le temps de céphaline activée (APTT) et le temps de thrombine (TT) de plasma humain (Stago®). Puis, le potentiel des F-Os à inhiber l'activité enzymatique de l'HPSE, a été évalué grâce à un test enzymatique basé sur le FRET. Enfin, les activités anti-migratoires des F-Os sur la viabilité cellulaire et la migration de la lignée cancéreuse MDA-MB-231 (modèle du TNBC), décrite pour surexprimer l'HPSE, ont été évaluées [58,72,269]. La comparaison des effets des F-Os avec ceux de plusieurs molécules « contrôles » de la migration et de l'inhibition de l'HPSE (Batimastat, suramine, héparine de BPM), nous a permis de bâtir les premières hypothèses du mécanisme d'action de ces F-Os.

## 2. Résultats et discussions

### 2.1. Dépolymérisation du fucoïdane natif et détermination des caractéristiques moléculaires de base des F-Os produits



**Figure 22.** Dépolymérisation radicalaire du fucoïdane natif commercial (de l'espèce *Fucus vesiculosus*) en appliquant un ratio  $\text{H}_2\text{O}_2$ /fucoïdane natif de 0,15 ou de 0,5. **(A)** Évolution de la masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) en fonction du temps des formulations de F-Os obtenues. **(B)** Effet de la réaction de dépolymérisation sur le degré de sulfatation (DS) des F-Os comparé aux  $\lambda$ -COs des différents fournisseurs. **(C)** Quantification des sucres réducteurs en fonction de l'évolution du  $M_n$ .

**Tableau 9.** Masses molaires ( $M_n$  et  $M_w$ ), degré de dépolymérisation moyen en nombre (DP), et indice de polydispersité ( $\mathfrak{D}$ ) calculés par des analyses en HPSEC-MALS (dans le cas du fucoïdane natif) ou en HPSEC-DRI (dans le cas des formulations de F-Os, en utilisant une gamme de standards d'héparines de  $M_n$  connus), et degré de sulfatation (DS) du fucoïdane natif et de l'ensemble des formulations de F-Os de la série 0,15 et 0,5 obtenues au cours de la réaction de dépolymérisation.

Natif/OS	Temps (h)	$M_n$ (Da)	$M_w$ (Da)	DP	$\mathfrak{D}$	DS % (m/m)
<b>Fucoïdane natif</b>	0	35 000	59 000	162	1,7	46,0 ± 1,4
<b>Série 0,15</b>	2	16579,7	26267,7	89	1,6	37,0 ± 3,0
	4	12624,9	20219,6	68	1,6	37,0 ± 4,1
	8	6176,4	16597,8	32	2,7	39,0 ± 3,6
	12	3707,3	7715,7	22	2,1	31,0 ± 7,9
	24	1979,5	4425,0	11	2,2	33,0 ± 4,0
	48	1504,4	2998,5	10	2,0	23,0 ± 4,9
	72	1214,8	2425,1	8	2,0	22,0 ± 6,1
	96	1034,7	2057,2	7	2,0	21,0 ± 3,2
	120	961,9	1818,3	6	1,9	23,0 ± 2,7
	144	905,5	1813,2	7	2,0	14,0 ± 4,5
<b>Série 0,5</b>	0,5	15022,1	20455,2	85	1,4	33,8 ± 0,7
	1	12552,7	19679,5	67	1,6	38,0 ± 1,0
	1,5	5135,4	10195,6	31	2,0	30,0 ± 2,3
	2	5029,6	9781,0	27	1,9	37,0 ± 1,3
	4	3013,2	5440,9	18	1,8	29,0 ± 1,5
	8	1730,7	3617,3	11	2,1	25,0 ± 1,1
	12	1489,3	3124,2	10	2,1	23,0 ± 1,5
	48	521,7	676,0	4	1,3	5,0 ± 1,6
	96	471,5	630,5	4	1,3	5,8 ± 0,5
	120	485,6	665,5	4	1,4	4,0 ± 1,2

---

Dans cette étude, le fucoïdane natif commercial issu de l'espèce *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour produire les F-Os. Comme précisé dans le tableau 11, les analyses d'HPSEC-MALS de ce PS natif ont permis d'estimer sa masse molaire en nombre ( $M_n$ ) à 35 kDa. Son DS de  $46\% \pm 1,4$  a été estimé par le test colorimétrique d'Azure A. Contrairement au DS qui apparaît assez élevé (par rapport à la fourchette de DS de 27-32 % de la littérature [270–272]), la valeur du  $M_n$  se rapproche de celles indiquées d'autres travaux de la littérature ayant trait à ce même fucoïdane natif commercial [272]. Des analyses par ICP-MS sont en cours pour obtenir une estimation plus précise du DS du fucoïdane natif.

Pour obtenir les dérivés de F-Os, deux ratios (0,15, 0,5) de  $H_2O_2$ /fucoïdane natif (m/m) ont été appliqués, résultant en deux séries nommées : série 0,15 et série 0,5. Les masses molaires de tous les OS générés ont été estimées grâce à des analyses par HPSEC-DRI utilisant une courbe de calibration de standards d'héparines de  $M_n$  connus (voir **Partie 2 : Matériels et méthodes**).

La **Figure 22 A-B** et le **Tableau 9** reconfirment les résultats consignés dans le **Chapitre 1** à savoir que la dépolymérisation par l' $H_2O_2$  induit une diminution du  $M_n$  et une désulfatation au cours du temps. La diminution du  $M_n$  est rapide jusqu'à 24 h, puis par la suite se ralentit, quel que soit le ratio  $H_2O_2$ /fucoïdane natif appliqué (**Figure 22 A**). Ce type de cinétique correspond à ce que nous avons obtenu dans le **Chapitre 1**, ainsi que dans nos précédents travaux, et pourrait être expliqué par une meilleure réactivité de l' $H_2O_2$  au début de la réaction. Nous constatons également qu'un ratio de 0,5 induit logiquement une cinétique de dépolymérisation plus rapide qu'un ratio de 0,15 (**Figure 22 A**). Concernant la désulfatation, nous remarquons qu'elle est également moins rapide au début de la dépolymérisation ( $M_n > 8$  kDa) (**Figure 22 B**). En revanche, à un  $M_n < 8$  kDa, la désulfatation est beaucoup plus rapide, certainement en raison d'une simplification de la structure et d'une meilleure accessibilité des groupements sulfates à l'agent de dépolymérisation. L'impact du ratio  $H_2O_2$ /fucoïdane utilisé pendant la dépolymérisation, sur le couple  $M_n$ /DS n'est pas très claire, mais il semble ne pas avoir d'influence. Autrement dit, pour un  $M_n$  donné, le DS mesuré reste pratiquement identique quel que soit le ratio  $H_2O_2$ /fucoïdane natif appliqué (**Tableau 9**).

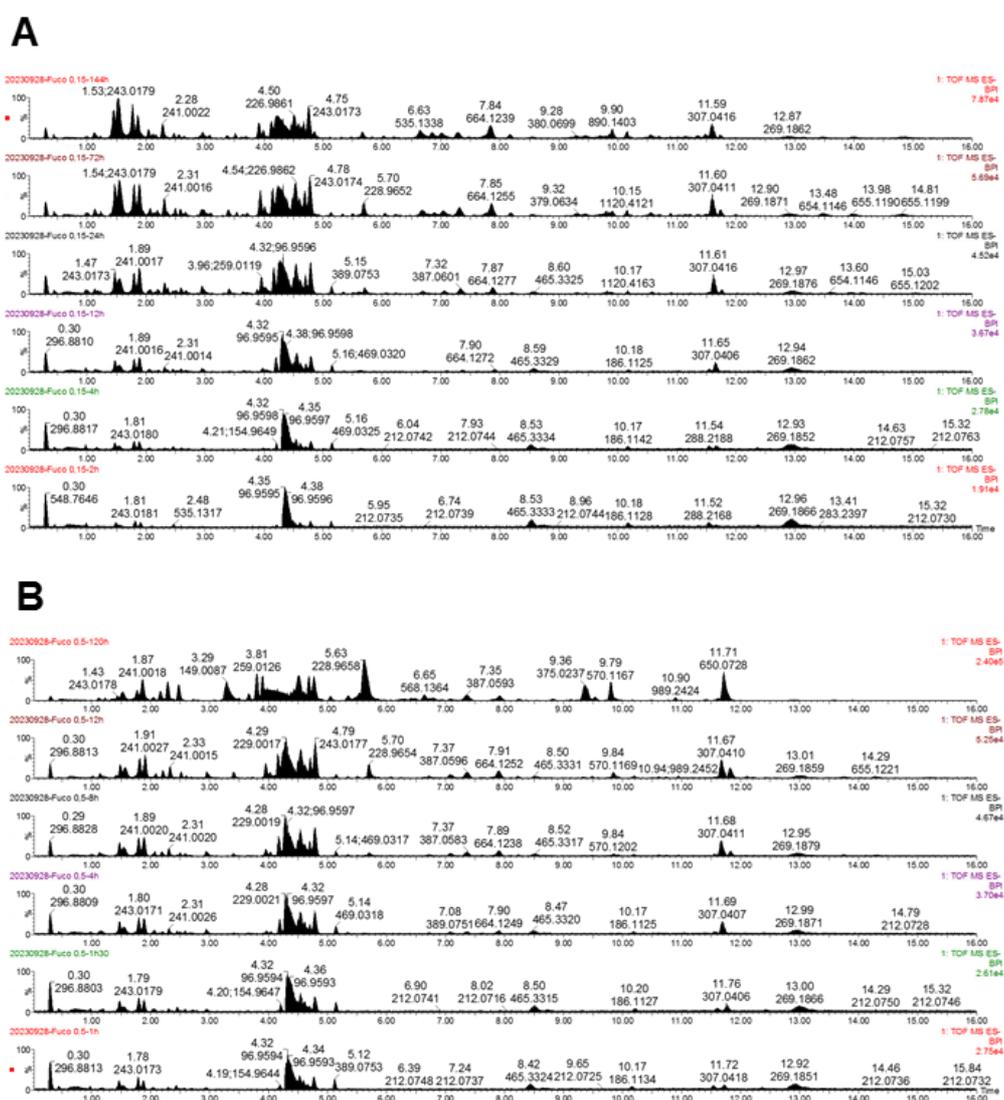
Nous nous sommes par la suite intéressés à la quantification des sucres réducteurs dans les solutions de F-Os obtenues, réalisée par le test colorimétrique WST-1. La **Figure 22 C** montre bien une augmentation dans la concentration en extrémités réductrices (exprimées en équivalent fucose) générées au cours de la réaction de dépolymérisation, quel que soit le ratio  $H_2O_2$ /fucoïdane natif appliqué. Néanmoins, ce test n'arrive pas à illustrer la différence de cinétique entre les séries 0,5 et 0,15 en début de dépolymérisation. Ce résultat confirme encore une fois que la diminution du  $M_n$  en fonction du temps de dépolymérisation du fucoïdane natif, est accompagnée de la formation de nouvelles extrémités réductrices de fucose. En revanche, contrairement aux résultats obtenus dans le cas des  $\lambda$ -COs (**Chapitre 1**), cette augmentation n'est pas suivie d'une diminution de la concentration en sucres réducteurs pour les OS de très BPM produits en fin de réaction. Pour rappel cette diminution observée par le test WST-1 dans le cas des  $\lambda$ -COs a été assimilée à une première indication de modifications structurales, qui a été ensuite confirmée par MS. Il est possible de suggérer que les taux de  $H_2O_2$  utilisés pour dépolymériser le fucoïdane natif n'ont pas été suffisants pour détecter ces sucres modifiés dans les solutions de F-Os. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une dépolymérisation avec un ratio plus élevé. Par exemple, un ratio  $H_2O_2$ /PS de 1,5 (w/w), qui est celui utilisé pour la dépolymérisation des  $\lambda$ -COs. De plus, ce test préliminaire colorimétrique ne donne qu'une première indication et ne permet pas de conclure définitivement qu'il n'y a pas eu de modification au niveau des monosaccharides terminaux des formulations de F-Os. Les analyses de MS permettront de compléter ces premières observations.

Ces résultats indiquent que :

- **Un ratio de  $H_2O_2$ /fucoïdane natif de 0,5 induit une dépolymérisation plus rapide, sans qu'il y ait de différence sur la désulfatation à  $M_n$  identique, par rapport à un ratio de 0,15.**
- **La génération d'extrémités réductrices se produit pendant la dépolymérisation.**
- **Les caractéristiques moléculaires de base ( $M_n$ , DS, WST-1) peuvent différer selon la méthode de caractérisation utilisée.**

A la suite des résultats de cette caractérisation des  $M_n$  et DS, nous avons sélectionné des F-Os de chaque série (**Tableau 9, cellules vertes**) de façon à avoir un large panel de candidats avec des  $M_n$  et DS différents entre chaque série, sur lesquels la suite des expériences a été réalisée.

## 2.2. Caractérisation structurale par UPLC-MS



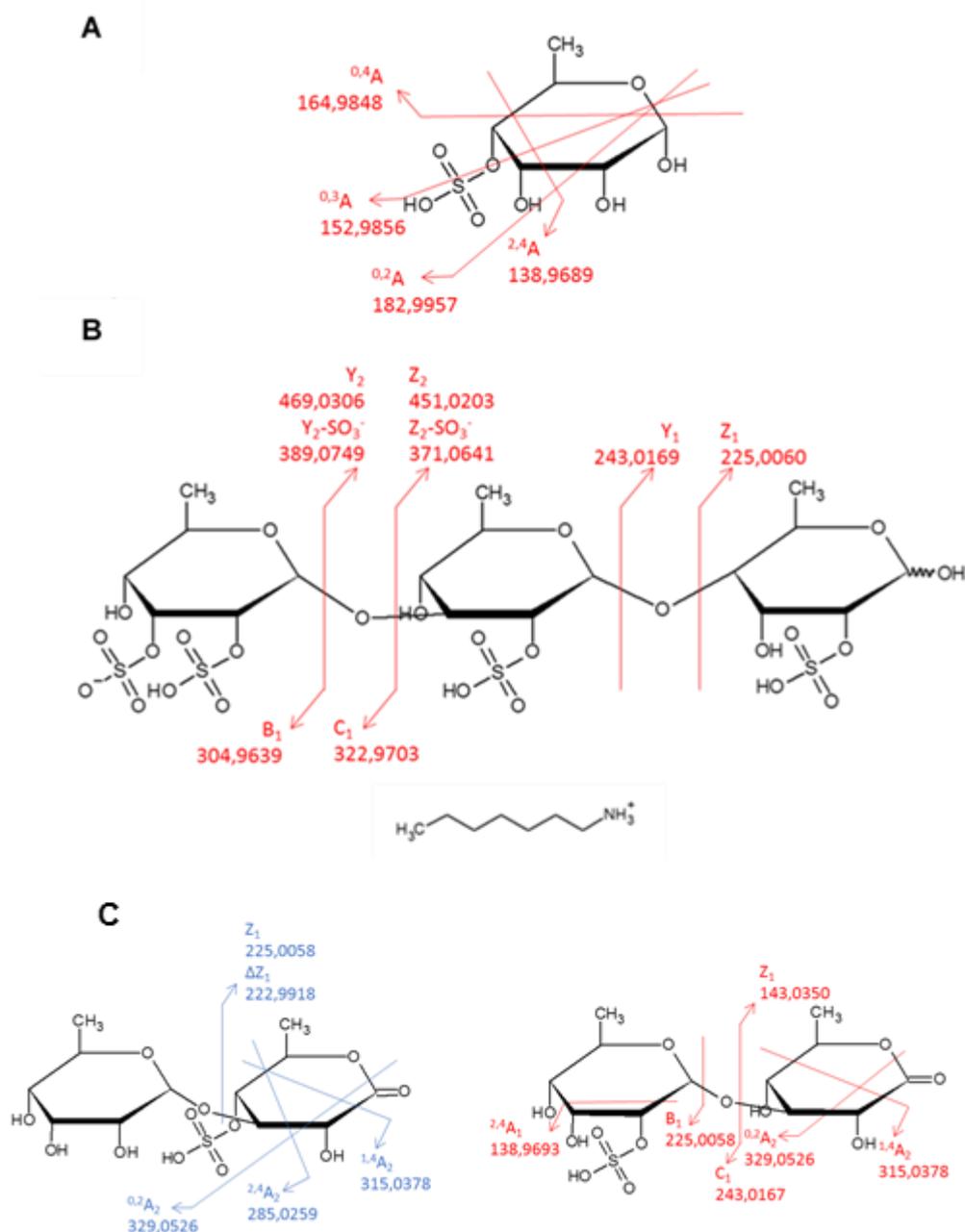
**Figure 23.** Profils chromatographiques de l'UPLC-MS des formulations F-Os sélectionnées de la série (A) 0,15 et (B) 0,5, obtenus par polarité négative.

L'UPLC-MS a été effectuée sur à une colonne  $C_{18}$  de phase inverse couplée par ion (heptyl ammonium formate-RPIR) et utilisant une source de type ESI q-TOF MS en polarité négative. L'analyse a permis de générer des chromatogrammes montrant l'ensemble des espèces ionisées détectées dans les formulations sélectionnées de la série 0,15 et 0,5 (**Figure**

23). Comme le montrent ces deux chromatogrammes, des espèces ont été détectées à différents temps d'élution dans toutes les formulations analysées, avec une complexité très apparente. Cela atteste déjà de la présence de différentes espèces dans les formulations de F-Os analysées. A première vue, il ne semble pas y avoir de différences majeures entre la série 0,15 et 0,5.

**Tableau 10.** Identification moléculaire des structures détectées dans les formulations de F-Os des séries 0,15 et 0,5 ayant la plus grande variation croissante d'apparition au cours de la réaction de dépolymérisation.

Entrée	tR	MSe ou MS/MS	Ion (m/z)			Ionisation	Formule moléculaire	Candidats	Série 0.15 F-O 144h	Série 0.5 F-O 120h
			Valeur expérimentale	Valeur prédite	Résolution (ppm)					
1	1'45	MS/MS	243,0173	243,018	2,9	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> S	Fucose sulfaté	56500	27500
2	1'77	MS/MS	243,0174	243,018	2,5	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> S	Fucose sulfaté	66500	62000
3	2'5	MS/MS	210,9914	210,9918	1,9	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	Produit de dépolymérisation sulfaté	11100	96800
4	3'95	MS/MS	259,0126	259,0129	1,2	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub> S	Hexose sulfaté	30100	159000
5	7'63	MS/MS	387,059	387,0602	3,1	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> S	Fuconosyl-fuconolactone	12200	34600
6	7'84	MS/MS	664,1257	664,1257	0,0	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>18</sub> S <sub>3</sub> <sup>-</sup> + C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> N <sup>+</sup>	Difucose trisulfaté	26400	29200
7	9'78	MS/MS	454,9808	454,9807	0,2	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>	Composé disulfaté	924	19300
8	9'9	MS/MS	890,1422	890,1404	2,0	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>25</sub> S <sub>4</sub> <sup>-</sup> + C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> N <sup>+</sup>	Trifucose tetrasulfaté	18700	6680
9	12'1	MS/MS	650,0728	650,0736	1,2	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>19</sub> S <sub>3</sub> <sup>-</sup> + C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> N <sup>+</sup>	Composé trisulfaté	7460	172000



**Figure 24.** Structure développée avec les fragmentations inter- et intra- cycliques en MS/MS du (A) fucose sulfaté, (B) trifucose tétrasulfaté, et de (C) la fuconosyl-fuconolactone.

Au vu de la complexité du mélange, augmentée par la grande sensibilité du système utilisé, les espèces représentatives des formulations F-Os ayant la plus grande variation croissante d'apparition au cours de la réaction de dépolymérisation ont été sélectionnées afin de caractériser leurs structures fines, de suivre leur évolution, et de confirmer si des différences peuvent se présenter selon le ratio  $\text{H}_2\text{O}_2$ /fucoïdane natif appliqué.

---

Comme le montre le **Tableau 10** parmi les espèces détectées, des motifs communs, d'autres non communs à la structure primaire des fucoïdanes ont été retrouvés :

- Le fucose sulfaté, le difucose trisulfaté, et le trifucose tétrasulfaté

Les résultats ont montré la présence du fucose sulfaté ( $C_6H_{12}O_8S$ ), l'espèce représentative de la structure des fucoïdanes, et cela dans les deux séries 0,15 et 0,5. Dans le fucose détecté dans la série 0,5 ; il n'y a pas eu de fragmentation cyclique en MS/MS produisant les ions, qui permettent de positionner le groupement sulfate. Par conséquent, il est possible d'attribuer ce dernier au C2, C3, ou C4. En revanche, dans le cas de la série 0,15 ; les fragmentations intra-cycliques ont permis de positionner un groupement sulfate sur le C4 (**Figure 24 A**). Ces résultats restent cohérents avec ceux de la littérature. En effet, dans l'étude bibliographique réalisée, nous avons rapporté que la structure du fucoïdane de l'espèce d'algue brune *Fucus vesiculosus* appartient au type II, avec une sulfatation majoritaire en C2, et mineure en C3 et en C4 [52,108]. Le fait qu'un seul groupement sulfate soit détecté sur le monomère de fucose, pourrait être le résultat d'une désulfatation.

En plus du fucose sous la forme monomérique, du difucose trisulfaté lié en  $\alpha(1-3)$ , et sulfaté en position 2 et 4 du premier résidu de fucose, et en C4 sur le second résidu ont été détectés. De plus, du trifucose tétrasulfaté a été détecté, sur lequel les liaisons en  $\alpha(1-3)$ , avec des sulfatations en C2 et C3 ont été positionnées en se basant sur la structure du fucoïdane de l'espèce *Fucus vesiculosus* décrite dans la littérature (**Figure 24 B**) [52,108]. L'**Annexe 1** montre un exemple de spectre qui a permis de caractériser le trifucose tétrasulfaté. Cette caractérisation indique que malgré de long temps de dépolymérisation, des espèces à DP2 et DP3 partiellement sulfatées restent présentes.

- Hexoses sulfatés

Des hexoses sulfatés ( $C_6H_{12}O_9S$ ) ont été détectés dans la série 0,5 ; pouvant correspondre à des ratios variables en sucres différents du fucose, à savoir, des glucoses, galactoses, mannoses, etc, comme il a été décrit dans la littérature [273].

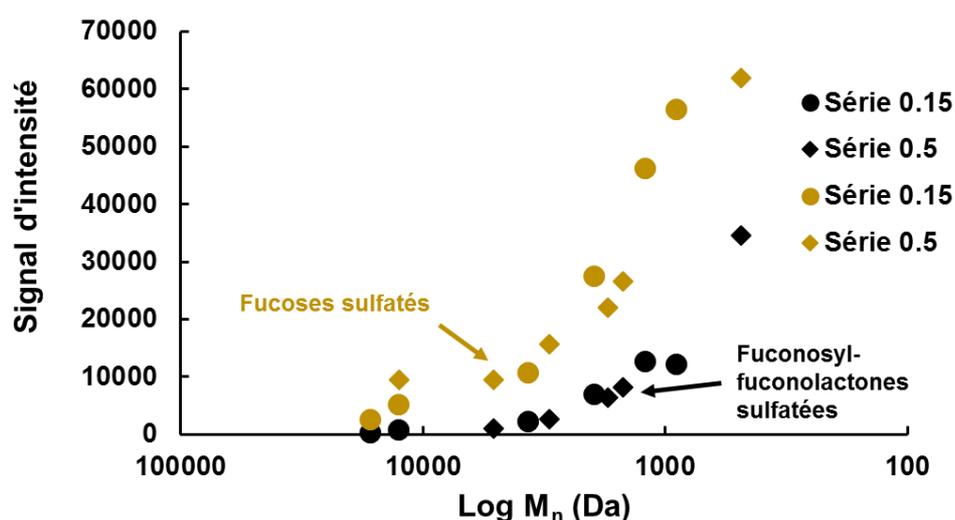
- Fuconosyl-fuconolactones sulfatés

Ces structures atypiques à deux monomères et sulfatées en C4 ( $C_{12}H_{20}O_{12}S$ ) sur l'un deux ont été détectées dans la série 0,5 et 0,15. Deux structures sont possibles, soit une sulfatation en C4

de la lactone, soit une sulfatation en C2 du fucose (**Figure 24 C**). Cette structure est certainement le résultat de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui a déjà été décrit pour engendrer des modifications structurales sur les OS produits au cours de la réaction de dépolymérisation du fait d'un environnement fortement oxydant [30]. D'ailleurs, dans le **Chapitre 1**, nous l'avons également observé dans le cas de la dépolymérisation des  $\lambda$ -CARs natifs commerciaux, à travers la détection d'espèces complexes (hautement oxydées, lactones, polyols, etc) dans les formulations des  $\lambda$ -COs.

- Autres produits sulfatés

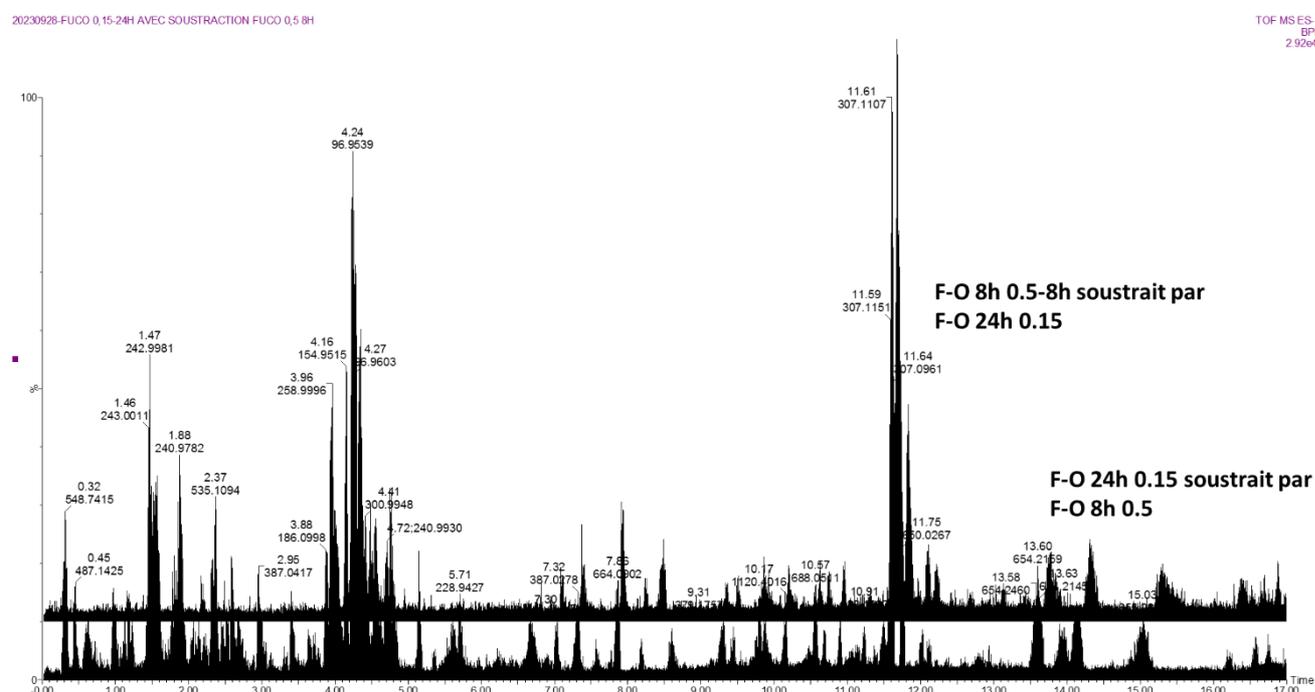
D'autres produits sulfatés ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_7\text{S}$ ), disulfatés ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_{16}\text{S}_2$ ) et trisulfatés ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_{19}\text{S}_3^-$  +heptylamine<sup>+</sup>), ont été détectés dans la série 0,5. Néanmoins, les structures de ces produits n'ont pas pu être élucidées.



**Figure 25.** Signal d'intensité du fucose sulfaté et de la fuconosyl-fuconolactone en fonction de la diminution du  $M_n$  et du ratio de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /fucoïdane natif appliqué.

Nous nous sommes ensuite centrés sur le suivi de l'évolution de ces espèces au cours de la réaction de dépolymérisation par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pour cela, un domaine de linéarité a été défini pour chacune des espèces en réalisant des gammes de concentrations des formulations de F-OS comprises entre 100 ng et 10  $\mu\text{g}$ . Nous avons également confirmé que l'apparition de ces différentes espèces s'intègre dans le domaine de linéarité en fonction du temps de dépolymérisation.

La **Figure 25** représente l'évolution du fucose sulfaté et des fuconosyl-fuconolactones sulfatées au cours de la réaction de dépolymérisation dans la série 0,15 et 0,5 en fonction du  $M_n$ . Les résultats montrent une augmentation (plus rapide à partir de 5 kDa) du signal en fucoses sulfatés et fuconosyl-fuconolactones sulfatés créés au cours de la dépolymérisation, et cela quel que soit le ratio de  $H_2O_2$ /fucoïdane natif appliqué. Néanmoins, il est intéressant d'observer qu'entre les séries 0,5 et 0,15, il n'y a pas de différences remarquables dans les signaux d'intensité détectés du fucose sulfaté et de la fuconosyl-fuconolactone. De manière intrigante, cela semble indiquer que pour une formulation d'OS de même  $M_n$ , il n'y a pas d'influence de la quantité de  $H_2O_2$  introduite sur la génération de ces deux espèces.



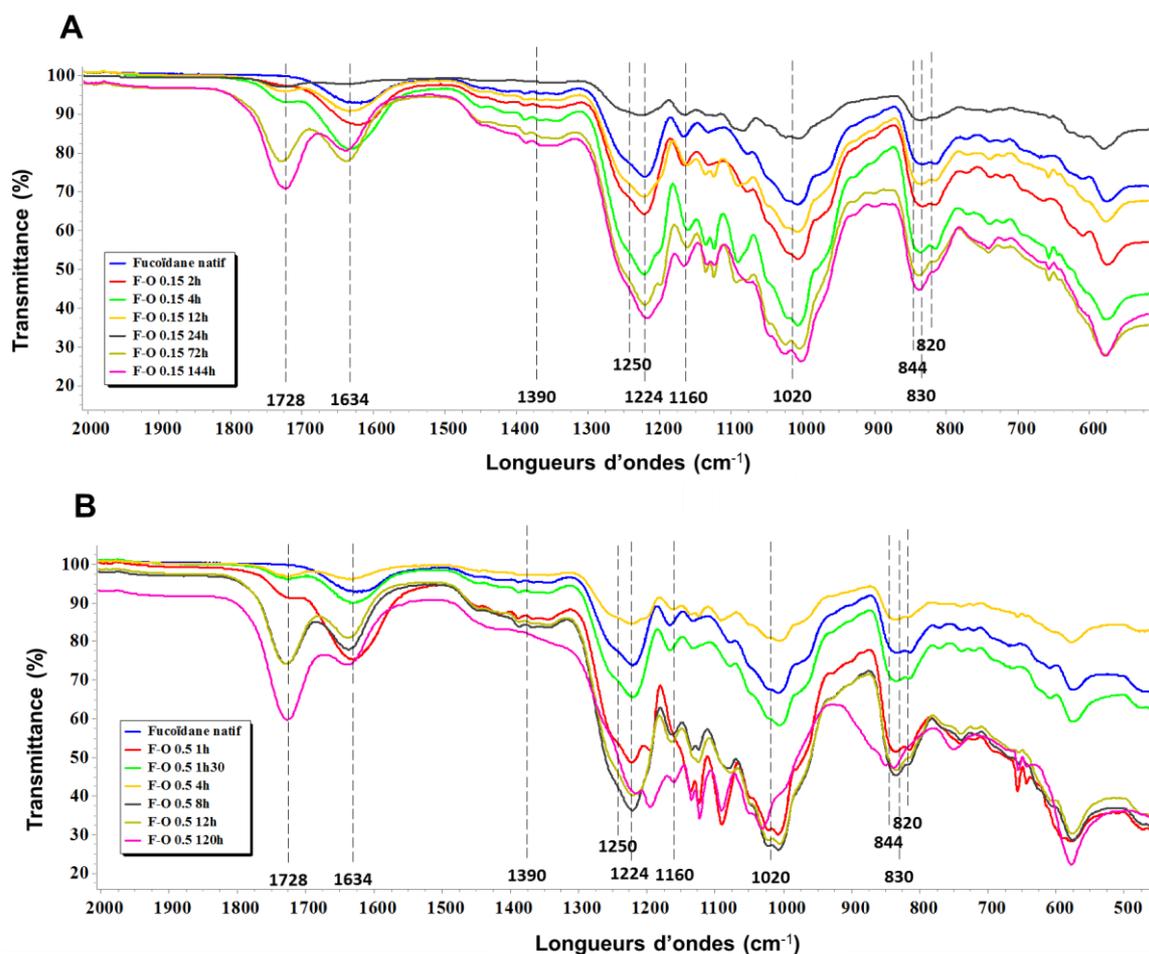
**Figure 26.** Traitements des signaux des chromatogrammes par soustraction du F-O 24h de la série 0,15 par le F-O 8h de la série 0,5 ; et inversement.

Pour confirmer ce résultat et mieux comprendre si la variation du ratio  $H_2O_2$ /fucoïdane natif pouvait induire des différences de structures entre les espèces de la série 0,15 et 0,5, nous avons comparé deux chromatogrammes de formulations de chaque série ayant des  $M_n$  très proches, à savoir, le F-O 24h de la série 0,15, et le F-O 8h de la série 0,5 (**Figure 26**). Après la soustraction des signaux du chromatogramme du F-O 24 h de la série 0,15 par celui du F-O 8h de la série 0,5, et inversement, ceux-ci ont été superposés. Bien qu'il apparaisse que dans la zone de 0 à 4 min, l'échantillon F-O 24h de la série 0,15 montre des signaux d'intensités

relatives de 20% plus élevés, cela reste néanmoins insuffisant pour valider un réel impact sur une différence qualitative d'espèces au sein des deux formulations.

Néanmoins, il est important de préciser qu'avec des analyses en UPLC-MS seules les espèces ionisables sont détectables. C'est-à-dire qu'il est fort probable qu'il y ait une grande partie des espèces au sein des formulations qui n'ont pas été détectées en UPLC-MS, en particulier celles complètement désulfatées. Par conséquent, il devient indispensable de réaliser d'autres analyses complémentaires afin d'avoir un profil plus complet de l'ensemble des espèces présentes dans les échantillons. Cela permettrait de compléter notre étude de l'impact éventuelle de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les compositions des F-Os et de pouvoir expliquer d'éventuelles différences de bioactivités par la suite. Nous avons choisi dans notre cas de réaliser des analyses FT-IR complémentaires présentées ci-dessous, afin de vérifier si d'autres espèces atypiques pouvaient être présentes dans les échantillons, et si elles y étaient préférentiellement dans une série (0,15 ou 0,5).

## 2.3. Caractérisation structurale par FT-IR



**Figure 27.** Spectres FT-IR du fucoïdane natif et des formulations F-Os de la série (A) 0,15 et (B) 0,5.

L'analyse spectrale par FT-IR du fucoïdane natif et des F-Os sélectionnés de chaque série a permis de déterminer les groupements fonctionnels présents au sein de leurs structures (**Figure 27 A-B**). Les signaux des spectres FT-IR des échantillons analysés montrent qu'ils sont bien représentatifs des principaux groupements fonctionnels retrouvés chez le fucoïdane de *fucus vesiculosus*, déjà caractérisé dans plusieurs études [260,272,274,275].

Le signal à 1728 cm<sup>-1</sup> a été attribué à la fonction C=O appartenant aux groupements O-acétyls. Si certains résidus minoritaires de fucose O-acétylé au sein du PS natif de *Fucus vesiculosus* ont déjà été décrits [272], dans notre cas, ce signal est absent du spectre du fucoïdane natif, mais bien présent dans tous les échantillons des formulations de F-Os dépolymérisées des deux séries. En appui des résultats des analyses de l'UPLC-MS, il est

---

possible d'attribuer ce signal à  $1728\text{ cm}^{-1}$  à la fonction C=O des lactones formées au cours de la réaction de dépolymérisation par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La large bande vers la région à  $1390\text{ cm}^{-1}$  résulte de la fixation du C-H asymétrique et symétrique des groupements méthyls présents sur les résidus de fucose [272]. Les signaux à  $1224\text{ cm}^{-1}$  et  $1250\text{ cm}^{-1}$  correspondent aux groupements esters sulfates (liaison S=O), et ils sont présents dans tous les échantillons analysés [260]. La bande à  $1160\text{ cm}^{-1}$  et celle à  $1020\text{ cm}^{-1}$  sont associées à des vibrations des élongations C-OH, C-C et C-O-C des anneaux de pyranoses [272].

Le signal à  $830\text{ cm}^{-1}$  est présent dans tous les échantillons analysés, et pourrait être assigné à de l' $\alpha$ -pyranose [260]. Le fucoïdane de l'espèce *Fucus vesiculosus* est décrit pour avoir des unités de L-fucopyranose alternées par des liaisons  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  3) et  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4), et le fait qu'il n'y ait qu'une seule bande à  $830\text{ cm}^{-1}$ , prouve la structure simple et linéaire de ce fucoïdane [260]. Au niveau de la région caractéristique des pyranoses, d'autres signaux (à  $844\text{ cm}^{-1}$  et à  $820\text{ cm}^{-1}$ ) peuvent être assimilés à la substitution  $-\text{OSO}_3^-$  [260]. Ces signaux peuvent également correspondre à des vibrations C-O-S, C-O, C-C et S-O [260]. Ces résultats concordent avec les analyses obtenues par UPLC-MS qui confirmeraient que la désulfatation au cours de la réaction de dépolymérisation n'est pas totale.

Le signal à  $1634\text{ cm}^{-1}$ , présent dans tous les spectres des échantillons analysés (mis à part sur le F-O 0,15 24h certainement en raison de la faible quantité en matière), peut s'interpréter des différentes manières :

- Selon l'étude de Flórez-Fernández *et al.* 2023, réalisée sur le fucoïdane natif commercial issu de l'espèce *Fucus vesiculosus*, celui-ci est attribué à des liaisons résultante de l'eau adsorbée [272].
- D'autres études ont proposé la possibilité que ce soit assigné à une vibration C=N de la mélanoidine, résultant d'une réaction de Maillard qui s'est déroulé pendant l'étape d'extraction [260]. En appui, l'étude de Ptak *et al.* 2021 a suggé que la présence éventuelle d'amines libres (provenant de la biomasse) dans le fucoïdane natif, pouvait induire une réaction de Maillard, et cela pendant le processus d'extraction, qui se tient à chaud [260]. Également, le signal à  $1420\text{ cm}^{-1}$  pourrait correspondre à la déformation du C-H de la mélanoidine [260].

- 
- En FT-IR, ce signal peut également être attribué à un amide primaire, mais nous remarquons l'absence d'amide secondaire (1480–1575  $\text{cm}^{-1}$ ), indiquant l'absence de peptides ou de protéines libre dans les échantillons. Mais cela n'écarte pas la présence d'acides aminés libres [260].

Ces observations nous font suggérer la présence de résidus aminés dans les échantillons analysés, qui auraient pu interagir avec les extrémités réductrices des sucres libérés au cours de la réaction de dépolymérisation.

La réaction de Maillard est une glycation qui a lieu entre un sucre réducteur et le groupement amine d'un acide aminé [276]. Elle se fait plus rapidement à de hautes températures (à partir de 100 °C), en revanche, à de faibles températures comme celle de la dépolymérisation (60°C), elle nécessite du temps [277]. Néanmoins, pour rappel, notre réaction a duré 144h. Nous avons réalisé un test de quantification d'amines libres dans le fucoïdane natif, grâce au test colorimétrique d'acide sulfonique 2,4,6-Trinitrobenzène (TNBS). Les résultats ont montré une présence minime d'amines libres à une concentration estimée à  $24,0 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$  (**Annexe 2**). Pour écarter, l'éventualité d'une réaction de Maillard, il faudrait maintenant quantifier ces amines libres sur les formulations de F-Os obtenues et de vérifier qu'il n'y a pas de diminution de leurs concentrations en fonction du temps de dépolymérisation (en raison d'un engagement dans la réaction de Maillard). A ce stade, du fait de **1**) la présence minime en amines libres dans le fucoïdane natif, **2**) son degré de pureté annoncé à  $\geq 95\%$ , et **3**) la température de la réaction à 60 °C, nous pensons que les conditions ne sont pas favorables à la possibilité de réactions de Maillard.

Plus probable ; les vibrations à 1600 et 1634  $\text{cm}^{-1}$  peuvent également correspondre à des liaisons C=C, C=O et  $\alpha,\beta$ -dicétones [260]. En effet, il a été décrit qu'à des températures élevées la déshydratation des sucres peut avoir lieu, induisant ainsi la formation des furfurals de faibles PM, constitués par un cycle hétéroaromatique et un groupement fonctionnel aldéhyde, d'où leur nom de « furaldéhydes » [278,279]. Cette hypothèse nous semble plus viable, et la présence d'une coloration brune dans l'échantillon F-O 144h à la suite de la lyophilisation, pourrait nous laisser penser à une caramélisation du sucre en raison d'une déshydratation (formation des furfurals).

Ces résultats indiquent que :

- **L'analyse UPLC-MS a permis d'identifier des motifs saccharidiques représentatifs des fucoïdanes (fucoses et hexoses sulfatés), mais la réaction de dépolymérisation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit une modification de la structure primaire en générant des espèces de types fuconosyl-lactones, ainsi que des produits de dépolymérisation sulfatés non identifiés.**
- **L'analyse FT-IR met en avant la présence de composés de types furfuraux formés au cours de la dépolymérisation**
- **La méthode de dépolymérisation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'induit pas une désulfatation totale.**
- **Le ratio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/fucoïdane natif n'induit pas de différences structurales détectables par UPLC-MS et FT-IR pour des formulations de M<sub>n</sub> identiques.**
- **Les analyses UPLC-MS et FT-IR n'offrent pas un profil complet/réel de l'ensemble des espèces présentes dans les échantillons dépolymérisés.**

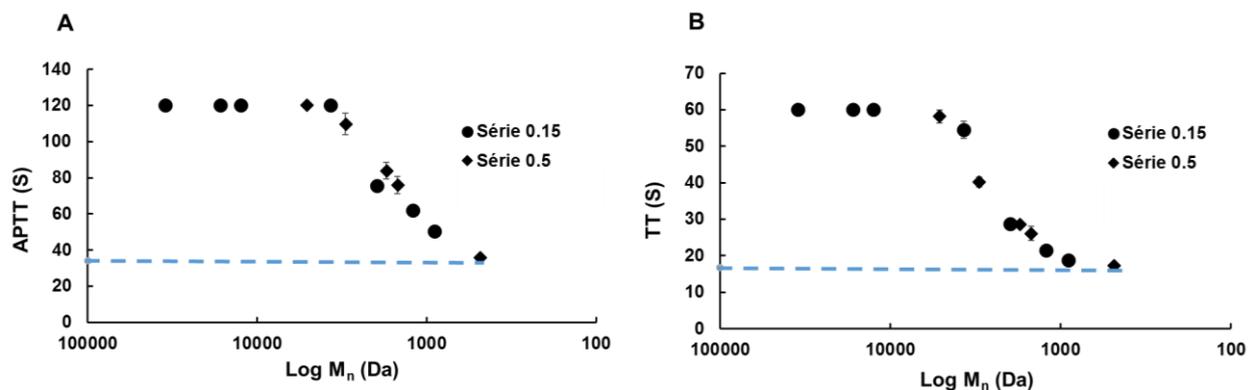
## 2.4. Criblage des activités biologiques *in vitro*

### 2.4.1. Activité anti-coagulante

L'activité anti-coagulante des fucoïdanes a été démontrée pour la première fois en 1941 chez l'espèce *Laminaria* [280], pour ensuite être révélée chez plusieurs autres espèces d'algues brunes [280].

Pour rappel, comme nous l'avons décrit dans l'introduction générale, des formulations d'actifs dotées d'une activité anti-coagulante ne sont pas favorables dans le cadre d'applications thérapeutiques anti-cancéreuses, et cela en raison d'un risque d'hémorragies internes. Par conséquent, nous avons vérifié la perte ou la limitation de l'activité anti-coagulante des F-Os produits.

Pour cela, nous avons exploré les effets des F-Os sur les différentes voies de la cascade de coagulation grâce à de classiques tests chronométriques en coagulométrie, sans pour autant approfondir leur mode d'action anti-coagulant, qui, dans le cas de fucoïdanes a déjà été décrit très largement dans la littérature [281].



**Figure 28.** Evaluation de l'activité anti-coagulantes des F-Os. Analyses chronométriques (A) APTT et (B) TT des activités anticoagulantes du fucoïdane natif et des formulations F-Os de la série 0,15 et 0,5 en fonction du M<sub>n</sub>. Les échantillons ont été testés à une concentration finale de 33,3 µg/mL pour le test APTT, et de 50 µg/mL pour le test TT. Les temps de coagulation des plasmas en l'absence d'inhibiteur (contrôle négatif H<sub>2</sub>O milliQ) sont de 34 s pour l'APTT et de 16,9 s pour le TT. Les temps maximums de coagulation pour chaque test sont de 180 s pour l'APTT, 60 s pour le TT. Le temps de coagulation basal est indiqué sur chaque graphe par la ligne pointillée en bleu.

La mesure du temps de céphaline activée (APTT) prend en compte les facteurs de la coagulation impliqués dans les voies intrinsèque et commune de la coagulation sanguine. Le temps de thrombine (TT) quant à lui prend en compte la voie commune de la coagulation, soit la fibrinogenèse. Les résultats ont montré une haute activité anti-coagulante incluant la voie intrinsèque (test APTT) et commune (test TT) (temps de saturation), pour le fucoïdane natif et les formulations de HPM. Cette activité diminue pour les formulations en dessous de 5 kDa et de façon identique quel que soit le ratio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/fucoïdane natif appliqué (**Figure 28 A-B**). Nos résultats concordent avec ceux de la littérature montrant que l'activité anti-coagulante des fucoïdanes est fortement favorisée par un DS et un M<sub>n</sub>, élevés, comme l'ont montré des études de structure-fonction réalisées à ce sujet [280,282].

Par ailleurs, nous avons également évalué l'effet des formulations de F-Os ainsi que celle du fucoïdane natif, sur la voie extrinsèque (mesurée par le temps de prothrombine « TP »). Les résultats ont montré qu'il n'y a aucune activité anti-coagulante impliquant la voie extrinsèque que ce soit pour les F-Os ou pour le fucoïdane natif (résultats non montrés). Ces résultats sont encore une fois cohérents avec ceux de la littérature [136,271].

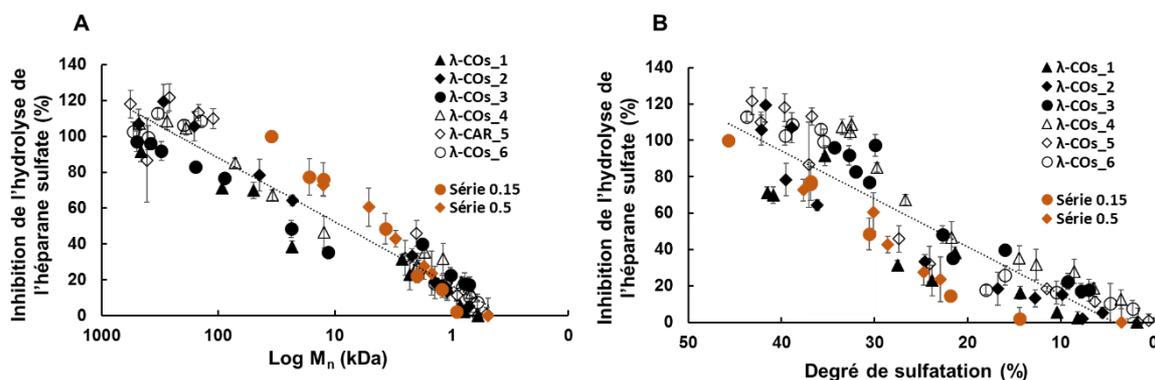
Ces résultats indiquent que :

**- La dépolymérisation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du fucoïdane natif commercial de l'espèce *Fucus vesiculosus* induit une diminution, voire, une perte de l'activité anti-coagulante des F-Os générés au cours du temps, comme déjà largement décrit par la littérature.**

#### 2.4.2. Activité anti-héparanase

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer la capacité des F-Os à inhiber l'activité enzymatique de notre cible d'intérêt : l'HPSE. Pour rappel, l'activité anti-HPSE des fucoïdanes à l'état natif ou dépolymérisé n'a été que très peu étudiée malgré la dense littérature relatant leurs activités anti-cancéreuses.

Au préalable, l'effet inhibiteur du fucoïdane natif commercial a été déterminé. Son IC<sub>50</sub> a pu être calculée grâce au test FRET (décrit dans la partie matériels et méthodes), puis comparée à celle de l'héparine native (standard de référence pour l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE) ainsi qu'à ceux des  $\lambda$ -CARs natifs commerciaux préalablement étudiés dans le **Chapitre 1**. Les résultats ont montré que l'IC<sub>50</sub> du fucoïdane natif ( $0,14 \pm 0,02$   $\mu\text{g/mL}$ ) (**Annexe 4**) était inférieur à celles des  $\lambda$ -CARs commerciaux ( $0,3-0,9$   $\mu\text{g/mL}$ ), ainsi qu'à celle de l'héparine native ( $0,63 \pm 0,04$   $\mu\text{g/mL}$  [58]). Ces résultats sont cohérents avec une des rares études précédemment effectuées. Dans cette étude, il est important de noter que la détermination de ces IC<sub>50</sub> a été basée sur une expérience *in cellulo* avec la lignée 13762 MAT de l'adénocarcinome mammaire du rat. Les cellules 13762 MAT traitées avec les PS ont étéensemencées sur une MET marquée avec Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> radioactif. Les surnageants des cellules ont été récupérés et ont été analysés par une électrophorèse SDS-PAGE afin de quantifier les produits de dégradation de HPM et de BPM du MET [22].



**Figure 29.** Evaluation de l'inhibition de l'activité enzymatique de la HPSE des F-Os. **(A)** Influence de la masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) sur l'activité anti-hépranase (HPSE) des formulations F-Os de la série 0,15 et 0,5 à 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . **(B)** Influence du degré de sulfatation sur l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE. Ces résultats ont été comparés à ceux des  $\lambda$ -COs des différents fournisseurs.

Pour évaluer la capacité des F-Os à inhiber l'activité de l'HPSE, une étude a été réalisée à pour une seule concentration des candidats sélectionnés de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Les résultats montrent que l'activité anti-HPSE des F-Os produits au cours du processus de dépolymérisation diminue, à la fois en fonction du Log  $M_n$  et du DS, et quel que soit le ratio  $\text{H}_2\text{O}_2$ /fucoïdane appliqué, et sans différence majeure entre les deux séries (**Figure 29 A et B**).

Comme la dépolymérisation radicalaire induit à la fois une réduction des  $M_n$  et une désulfatation, il est difficile de distinguer le paramètre le plus influent sur l'activité anti-HPSE entre le  $M_n$  et le DS. Ces résultats confirment une nouvelle fois l'importance du  $M_n$ , mais aussi du DS pour cette activité, comme nous avons pu le démontrer dans le **Chapitre 1**, et précédemment dans nos travaux publiés [48]. Nous avons suggéré dans le **Chapitre 1**, que le DS pourrait probablement être plus important que le  $M_n$  dans l'inhibition de l'activité HPSE. De plus, comme nous l'avons déjà évoqué, une étude a suggéré que l'HPSE serait capable de reconnaître certains profils de sulfatation que la séquence saccharidique sulfatée elle-même [233]. Néanmoins, comme nous l'avons discuté dans le **Chapitre 1**, il n'est pas possible en l'état d'en tirer une conclusion claire, et cela en raison de la méthode de dépolymérisation choisie, qui réduit le  $M_n$  tout en désulfatant. Afin de conclure définitivement, il serait pertinent d'utiliser une méthode alternative de dépolymérisation qui ne désulfate pas (par exemple

enzymatique), en la complétant avec une désulfatation totale de certains F-Os (par voie chimique), pour disposer d'une notre étude structure-fonction plus aboutie.

Par la suite, une comparaison des activités anti-HPSE (réalisée à 2,5 µg/mL) des F-Os sélectionnés de chaque série a été faite avec celles de λ-COs produits à partir de chaque fournisseur des natifs (**Figure 29 A**). Nous remarquons que globalement, pour un même DS, l'inhibition de l'HPSE par les F-Os est plus faible (**Figure 29 B**).

Autement dit, pour atteindre le même degré d'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE, il semblerait qu'il faille des chaînes de λ-COs plus longues mais avec moins de sulfates (**Figure 29A**). En revanche, en dessous d'un  $M_n$  de 3 kDa, l'activité anti-HPSE des F-Os des deux séries devient équivalente à celle des λ-COs, et ceci quel que soit le fournisseur. Pour compléter cette première analyse, nous avons comparé les  $IC_{50}$  de deux candidats F-Os (F-O 72h série 0,15 : 1,5 kDa, DS 23%; F-O 12h série 0,5 : 1,2 kDa, DS 22%) à ceux des λ-COs et de l'héparine de BPM, avec des caractéristiques basiques plus ou moins similaires. Il est intéressant de noter que les  $IC_{50}$  sont dans le même ordre de grandeur (F-O 72h série 0,15 :  $10 \pm 4$  µg/mL ; F-O 12h série 0,5 :  $8 \pm 1$  µg/mL) (**Annexe 4**), renforçant ainsi les perspectives d'applications F-Os comme inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'HPSE.

Afin de pouvoir aller plus loin dans les différentes capacités des OS à inhiber l'HPSE, des expériences de docking *in silico* pour les F-Os sont en cours de réalisation.

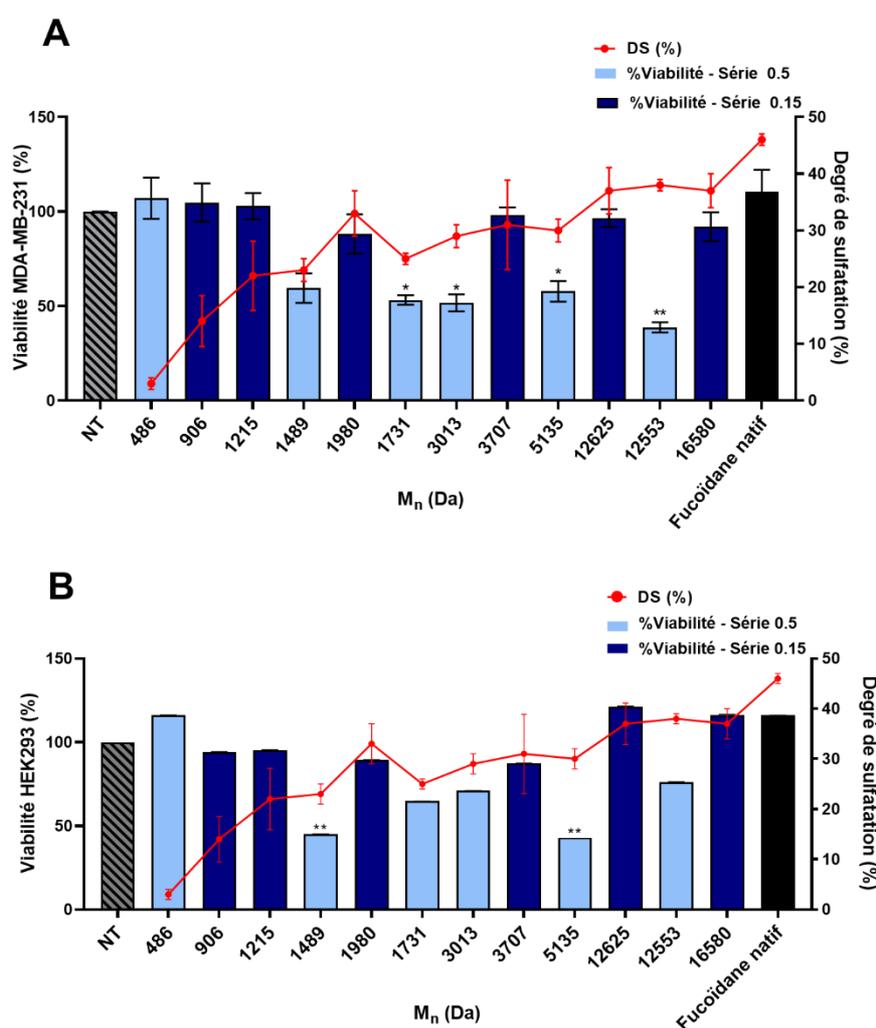
Ces résultats indiquent que :

- **Le fucoïdane natif (extrait de l'algue *Fucus vesiculosus*) semble être un meilleur inhibiteur de l'activité enzymatique de l'HPSE comparativement à l'héparine native et aux λ-CARs natifs commerciaux.**
- **Pour la première fois, une étude de relation structure/fonction des capacités de formulations de F-Os à inhiber HPSE a été menée.**

## 2.5. Criblage des activités biologiques *in cellulo*

### 2.5.1. Effet des F-Os sur la viabilité des lignées MDA-MB-231 et HEK293

Des candidats sélectionnés de chaque série a été testée sur la viabilité de la lignée cancéreuse du TNBC « MDA-MB-231 » à une concentration de 100 µg/mL pendant 24h par un test utilisant le réactif MTT. Les résultats montrent que par rapport au contrôle non traité et au fucoïdane natif, il n’y a aucune activité anti-métabolique significative des F-Os sélectionnés appartenant à la série 0,15. Cependant, les candidats issus de la série 0,5 ; les F-Os de  $M_n$  intermédiaire (1700-13000 Da) induisent une baisse de la viabilité des cellules jusqu’à 45% (Figure 30 A).



**Figure 30.** Evaluation de l’effet des formulations F-Os sélectionnées de la série 0,15 et 0,5. Effet sur la viabilité de (A) la lignée cellulaire cancéreuse humaine modèle TNBC « MDA-MB-231 » et de (B) la lignée cellulaire non cancéreuse HEK293, comparée au fucoïdane natif (35000 Da), après 24h de traitement à une concentration de 100 µg/mL. NT : non traité. DS : degré de sulfatation.

---

Des expériences supplémentaires (**résultats non montrés**) ont permis d'écartier l'hypothèse que cet effet soit lié à des résidus d' $\text{H}_2\text{O}_2$  au sein des solutions de F-Os. L'activité cytotoxique des formulations issues de la série 0,5 pourrait donc s'expliquer par une plus forte concentration d'espèces induisant un ralentissement du métabolisme cellulaire par rapport à la série 0,15. Les résultats d'analyses issues de l'UPLC-MS et du FT-IR ont bien permis de détecter des espèces atypiques (fuconosyl-fuconolactones, des produits de dégradation dont probablement des furfurals) issues de la dépolymérisation par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Des études ont déjà démontré la capacité des lactones à induire une toxicité importante contre des différentes lignées cellulaires du cancer du sein dont les MDA-MB-231 [283–285]. D'autres expériences ont également prouvé que certaines lactones pouvaient être toxiques sur des cellules normales humaines dermiques fibroblastiques (NHDF) [284]. En ce qui concerne les furfurals et les aldéhydes de manière générale, ils sont également décrits pour leur cytotoxicité notamment en induisant des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN) [278,286,287].

Cependant, ces analyses n'ont pas montré de différences qualitatives ou quantitatives des structures générées entre les deux séries 0,15 et 0,5 ; lorsque les F-Os ont des  $M_n$  et de DS similaires. Il est donc difficile d'expliquer pourquoi les effets ne sont exercés que par les F-Os de la série 0,5. Notre seule hypothèse restante est la suivante : d'autres espèces modifiées (lactones, furfurals, ou autres) non détectables en UPLC-MS, et non caractérisées en FT-IR, pourraient être présentes de manière plus abondante dans ces solutions de  $M_n$  intermédiaire issue de la série 0,5. L'influence de ces dernières sur la viabilité des cellules cancéreuses aurait également tendance à diminuer au cours de la dépolymérisation. Dans ce sens, il faut noter que ces formulations de  $M_n$  assez élevés (1700-13000 Da) sont plus difficiles à s'ioniser en MS, rendant la détection de telles espèces plus difficile.

Pour mieux comprendre le mécanisme lié à ces effets, il serait intéressant de réaliser d'une part des expériences d'analyse du cycle cellulaire et d'apoptose afin de valider s'il s'agit réellement d'un effet cytotoxique ou uniquement d'une baisse de l'activité métabolique, et d'une autre part, de compléter la caractérisation structurale par une analyse quantitative en RMN.

Dans la suite de notre étude, nous avons testé si les formulations sélectionnées de la série 0,5 étaient également toxiques sur des cellules normales. Pour ce faire, les cellules de la

lignée HEK293 ont été sélectionnées. Les résultats ont montré qu'après 24h de traitement avec les candidats à une concentration de 100 µg/mL, celles-ci avaient un effet (pour certains significatifs) sur la viabilité de ces cellules non cancéreuses (**Figure 30 B**). Ce résultat montre ainsi que les formulations de F-Os, obtenues dans ces conditions de dépolymérisation, semblent ne pas avoir une action anti-métabolique sélective des phénotypes de cellules malignes.

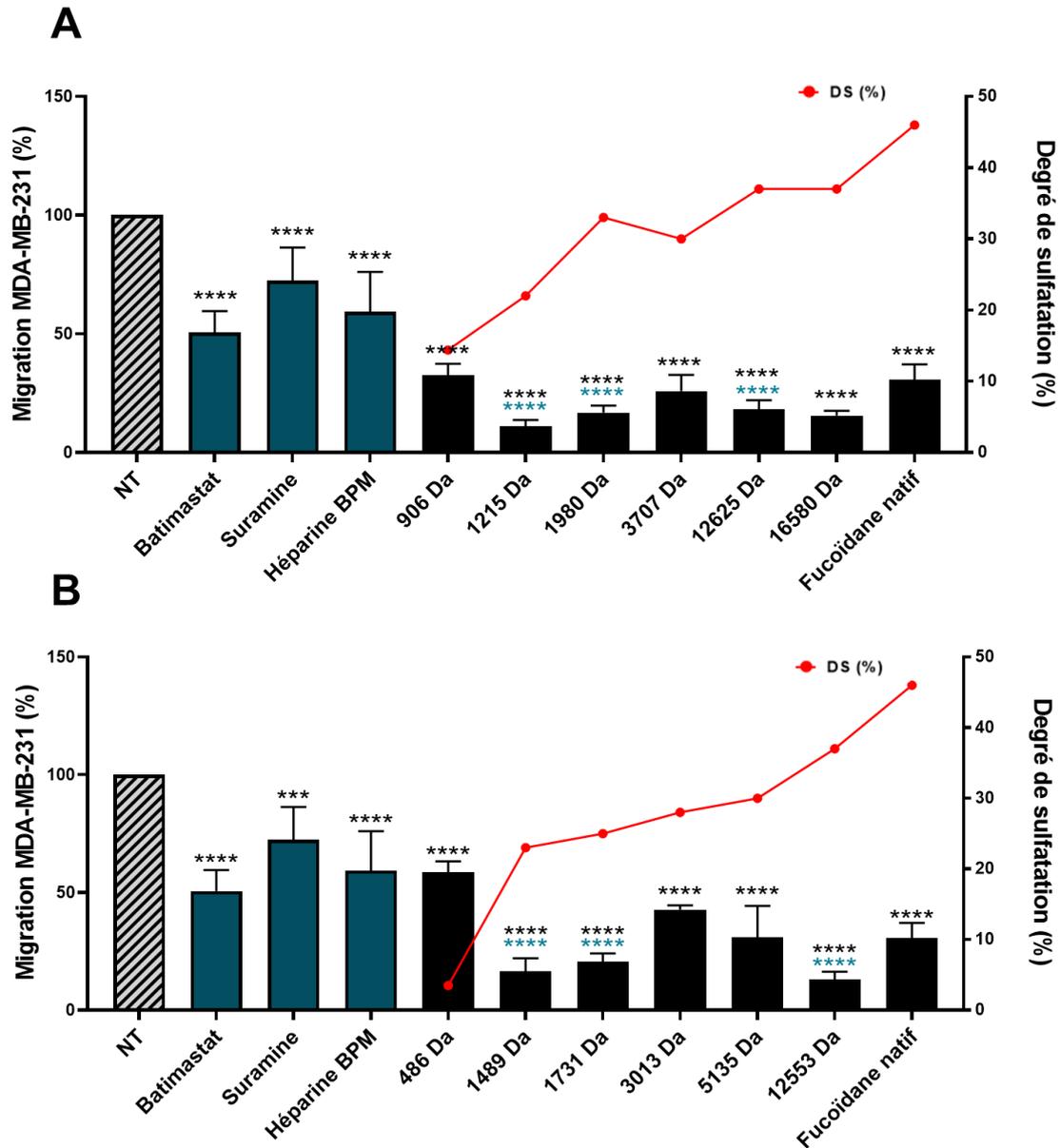
Ces résultats indiquent que :

- **Les F-Os obtenus par une dépolymérisation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent être toxiques sur les cellules MDA-MB-231 en raison de la présence de structures atypiques formées au cours de la réaction.**
- **Sur les cellules normales de types HEK293, la non-sélectivité reste à confirmer à travers des tests supplémentaires plus précis (cycle cellulaire et apoptose).**

#### 2.5.2. Effets sur la migration des cellules MDA-MB-231

Afin d'évaluer l'effet du fucoïdane natif et des différentes formulations de F-Os issus de chaque série sur la migration des cellules MDA-MB-231, des concentrations auxquelles ces formulations ne présentaient pas d'effet significatif sur la viabilité cellulaire ont été choisies. En ce qui concerne la série 0,15 ; la concentration à 100 µg/mL a été maintenue, car elle ne présentait aucun effet anti-métabolique significatif. Pour la série 0,5, des expériences supplémentaires ont été réalisées, et ont permis de valider la concentration de 25 µg/mL pour ne pas avoir d'effet sur la viabilité de ces cellules.

Les expériences de migration ont été réalisées en utilisant des plaques de 96 puits spécifiques (Oris™ cell migration assay fibronectin coated-Platypus teubio), contenant des fonds de puits recouverts de fibronectine et un insert amovible. Dans ces expériences, des molécules contrôles ont été utilisées, à savoir, le batimastat, la suramine et l'héparine de BPM (pour les doses, voir **Tableau 8**). Le premier est un inhibiteur de migration indépendant d'une inhibition de l'HPSE, le second est un inhibiteur de l'HPSE qui n'est pas de base saccharidique et le 3<sup>ème</sup> est un standard de référence pour les oses inhibiteurs de l'HPSE.



**Figure 31.** Evaluation de l'activité anti-migratoire des formulations F-Os sélectionnées sur les cellules MDA-MB-231 après 24h de traitement. (A) traitement avec 100 µg/mL des F-Os sélectionnés de la série 0,15 et (B) avec 25 µg/mL des F-Os de la série 0,5. Le fucoidane natif, le batimastat, la suramine, et l'héparine de BPM, ont été inclus comme contrôles positifs. \*\*\* : comparé par rapport au contrôle non traité (NT), \*\*\*\* : comparé par rapport au batimastat, suramine, et l'héparine de BPM. DS : degré de sulfatation (n=4 par condition de traitement pour une plaque N=1).

Les résultats montrent qu'après 24h de traitement avec le contrôle batimastat, 55% de la migration des cellules est inhibée (**Figure 31** et **Annexe 5**). Les inhibiteurs d'HPSE, la suramine et l'héparine de BPM, contrôlent aussi la migration mais de manière moins efficace, avec des inhibitions de 36 et de 25 %, respectivement (**Figure 31**). Concernant les sucres algaux, le fucoïdane natif a induit la plus forte inhibition (77 %), comparativement aux trois molécules contrôles de références utilisées (**Figure 31**). De plus, de manière intéressante, les candidats F-Os de la série 0,15 ont également inhibé la migration cellulaire de 63 à 90 % selon la formulation utilisée (**Figure 31 A**), tout comme ceux de la série 0,5 avec un effet d'inhibition entre 59 et 84 % (**Figure 31 B**). Il est intéressant de constater que globalement les formulations F-Os des deux séries, présentaient une activité anti-migratoire similaire voir légèrement supérieure par rapport au fucoïdane natif ne traduisant pas d'impact négatif de la dépolymérisation sur cette activité.

Dans l'étude de Deux *et al.* 2002, grâce à un marquage avec un fluorochrome il a été démontré qu'un F-O (8 kDa) était capable d'être internalisé [288]. Il est donc possible d'appuyer la suggestion de l'étude de Yang *et al.* 2008, sur le fait que l'internalisation des F-Os dans les cellules cancéreuses puissent être facilitée par leur BPM, permettant une meilleure action anti-cancéreuse intracellulaire [49]. Une expérience de visualisation par microscopie du degré d'internalisation des F-OS sera prochainement menée pour confirmer cette hypothèse. L'influence du taux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilisé lors de la dépolymérisation sur les propriétés anti-migratoires des F-Os ne peut, à ce stade, être évalué car les F-Os n'ont pas été testés à la même dose. Des expériences sont en cours pour étudier les effets de la série 0,15 à une dose similaire de celle de la série 0,5 : 25 µg/mL.

Les forts effets observés du fucoïdane natif et des F-Os contre la migration des MDA-MB-231 sont en phase avec plusieurs données d'articles publiés précédemment [224,289]. Néanmoins, ces derniers n'avaient pas spécifiquement étudié le lien possible avec l'activité anti-HPSE des F-Os. D'après le crible *in vitro*, les F-Os ont une activité anti-HPSE moins importante que les héparines, mais ils présentent pourtant de meilleurs effets anti-migratoires. Cela ouvre deux hypothèses, la première étant une interaction plus spécifique/privilégiée avec l'HPSE que les 2 premiers contrôles. La seconde, plus probable, suggère que l'effet migrastatique pourrait provenir pour partie de l'inhibition de HPSE mais aussi d'autres mécanismes telle qu'une régulation de l'expression génique de l'HPSE, ou une interaction avec

des facteurs de croissance [58,254]. Pour étayer cela, nous pouvons nous référer aux travaux publiés par notre équipe [58]. Ces derniers décrivaient un effet anti-migratoire plus important pour les  $\lambda$ -COs que pour les héparines de BPM, ceci malgré une activité anti-HPSE inférieure. Grâce à un modèle transfecté de MDA-MB-231 pour réprimer l'HPSE et plusieurs autres tests biologiques, nous avons pu mettre en évidence que les héparines de BPM avaient effectivement des interactions avec d'autres cibles moins impliquées dans la migration des MDA-MB-231. D'autre part, nous avons démontré que les mécanismes à l'origine des effets du  $\lambda$ -CO provenaient bien pour partie de l'inhibition de l'activité HPSE mais impliquait également d'autres voies.

L'ensemble de ces résultats souligne les limites d'un criblage monophénotypique d'OS *in vitro*. Du fait de leur caractère « multitasking » et « poly-pharmacologique », il pourrait apparaître beaucoup plus judicieux d'effectuer des études structure/fonction directement sur des tests *in cellulo* qui offrent un modèle multicibles beaucoup plus réalistes pour aider à la sélection de nos meilleures formulations d'OS.

Ces résultats indiquent que :

- **L'activité anti-migratoire des formulations F-Os dans les cellules MDA-MB-231, ne dépend pas de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE.**
- **Les formulations F-Os peuvent exercer un effet « poly-pharmacologique » par la diminution de la viabilité et l'inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231.**

## Section 2- Oligosaccharides de fucoïdanes régulateurs de l'expression du point de contrôle PD-L1

### Article 3- publié

#### **Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic vLMW Fucoidan Formulas Decrease PD-L1 Surface Expression in EBV Latency III and DLBCL Tumoral B-Cells by Decreasing Actin Network**

Saliba, J.; **Manseur, C.**; Groult, H.; Akil, H.; Tannoury, M.; Troutaud, D.; Maugard, T.; Feuillard, J.; Arnaudin, I.; Jayat-Vignoles, C. *Mar. Drugs* 2023, 21, 132. <https://doi.org/10.3390/md21020132>.

IF<sub>2023</sub> = 5,4

---

## 1. Introduction

Pour adresser la question « poly-pharmacologie » des formulations de F-Os produites, dans un autre contexte pathologique que le cancer solide, nous avons réalisé un travail collaboratif avec le laboratoire CRIBL de l'université de Limoges (UMR CNRS 7276, INSERM 1262). Il s'agissait d'un projet de thèse mené par Jennifer Saliba, qui consistait à l'étude des effets anti-cancéreux de deux formulations de F-Os de très bas poids moléculaire (tBPM-F) précédemment préparées dans notre laboratoire par une dépolymérisation radicalaire par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces effets ont été mesurés sur plusieurs lignées cellulaires tumorales modèles d'un cancer liquide lymphoprolifératif : le lymphome B associé au virus d'Epstein Barr (EBV). Ce dernier est un virus oncologique qui touche plus de 95% de la population mondiale [290]. Il a la capacité d'immortaliser les lymphocytes B et est associé à plusieurs types de lymphomes [290]. Dans ce travail, la cible protéique d'intérêt a été PD-L1 (Programmed Death Ligand-1), un célèbre point de contrôle immunitaire. Les travaux de l'équipe 2MB2C (Molecular Mechanisms of B Cell Cancerogenesis) du CRIBL ont démontré une importante surexpression de PD-L1 sur les lymphomes B en latence III de l'EBV. De plus, ils ont montré que sa liaison à son récepteur PD-1 exprimé par les lymphocytes T, en conjugaison avec la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF $\beta$  et IL-35), leur permettait de réprimer la réponse anti-tumorale [291].

L'immunothérapie est un bon moyen de rétablir la fonctionnalité de la réponse T cytotoxique. Elle consiste à employer des anticorps bloquants de PD-L1 ou de PD-1 [290]. Ces traitements par immunothérapie ont largement fait leur preuve, cependant, comme la chimiothérapie, ils présentent certaines limites telles que des résistances acquises au traitement, de forts effets secondaires ou une perte d'efficacité, qui peuvent contrebalancer l'effet thérapeutique des anticorps [290]. Afin de pallier ces inconvénients, plus récemment la recherche s'est intéressée à trouver des molécules capables d'agir en aval, c'est-à-dire de baisser l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales plutôt que bloquer son interaction [290]. Dans d'autres types de cancer solides, plusieurs études ont suggéré que le fucoïdane ou ses dérivés de BPM pouvaient induire une telle baisse de l'expression transcriptionnelle de PD-L1 [292,293].

Dans notre cas, cette recherche a été appliquée dans le cadre de lymphomes B associés à l'EBV, déjà décrits pour surexprimer PD-L1. Les travaux menés ont été publiés par Saliba *et*

al. 2023, dans lesquels je suis associée comme deuxième auteure [179]. Cette contribution scientifique a consisté en la préparation de formulations de tBPM-F par une dépolymérisation radicalaire à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à partir du même fucoïdane natif commercial issu de l'espèce *Fucus vesiculosus*, puis en la détermination des caractéristiques moléculaires de base ( $M_n$ , DP, Đ et DS) de ces formulations, ainsi que celles du fucoïdane natif.

Puis, le but a été d'évaluer leurs effets anti-prolifératif et pro-apoptotique, ainsi que leurs effets sur l'expression transcriptionnelle et protéique de PD-L1. Trois lignées cellulaires lymphoblastoïdes établis au laboratoire CRIBL par le Généthon (LCLs : lymphocytes B en latence III de l'EBV- J1209, C0401, C1504), et quatre lignées de lymphomes B courants (DLBCL : lymphomes diffus à grandes cellules B– U2932, OCILy10, SUDHL4 et SUDHL6), surexprimant PD-L1 ont été testées.

## 2. Résultats et discussions

### 2.1. Conception et caractérisation structurale des formulations de fucoïdane de très bas poids moléculaire (tBPM-F)

Afin d'approfondir l'effet thérapeutique des fucoïdanes et de ses dérivés de tBPM-F dans les lymphomes à cellules B associés à l'EBV (LCLs) ou pas (DLBCLs), le fucoïdane natif commercial de l'espèce d'algue brune *Fucus vesiculosus* a été dépolymérisé par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  afin de produire les formulations F1 et F2 de la même manière que dans la partie 2.1 du **Chapitre 2**. Les estimations des caractéristiques moléculaires de base ( $M_n$  et DS) ont donné les résultats suivants : F1, 604 Da, DS 6,0 %  $\pm$  1,0 %; F2, 562 Da, DS 2,1 %  $\pm$  0,4%.

### 2.2. Inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose dans les cellules B tumorales

Dans cette étude, les formulations F1 et F2, ainsi que le fucoïdane natif, ont été testés à une concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant 48h dans toutes les expériences. Après un traitement des cellules LCLs et DLBCLs avec les formulations de tBPM-F F1 et F2, et avec le fucoïdane natif, une diminution significative de la prolifération cellulaire a été observée par une analyse mono-paramétrique du cycle cellulaire par cytométrie en flux. En comparant à la condition contrôle (non traitée), les résultats ont montré des baisses significatives du pourcentage des

---

cellules en phase S (duplication de la quantité d'ADN) lorsqu'elles étaient traitées avec les formulations F1 et F2, contrairement au fucoïdane natif.

Parallèlement, une augmentation occasionnelle du pourcentage des cellules en phase subG1 a été observée, notamment chez les cellules LCLs en présence de la formulation F2, ce qui est un marqueur d'une apoptose tardive. La réponse apoptotique a été par la suite confirmée grâce à un test Annexin-V phosphatidylserine (Annexin-V/IP) par cytométrie en flux. Les résultats ont montré une induction significative de la proportion de cellules en apoptose en présence des deux formulations contrairement au traitement avec le fucoïdane natif qui ne produisait pas de différence significative par rapport au contrôle.

**L'ensemble de ces premiers résultats a permis de démontrer, pour la première fois, les effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques des dérivés de tBPM-F sur les DLBCLs et les LCLs.** Dans ce contexte pathologique, ces formulations originales étaient beaucoup plus efficaces que le fucoïdane natif de l'espèce *Fucus vesiculosus* fréquemment rapporté pour ses effets cytotoxiques sur certaines lignées de DLBCLs [294]. Ces résultats ont démontré un impact bénéfique du procédé de dépolymérisation sur les propriétés cytotoxiques des fucoïdanes. Enfin, les mêmes expériences réalisées sur les cellules immunes B et T normales n'ont pas révélé d'effets significatifs en présence des F-Os démontrant ainsi la sélectivité des effets. Cette dernière est une propriété très recherchée dans l'exploration de nouveaux principes actifs anti-cancéreux.

### 2.3.Effets sur PD-L1 à travers la destruction du réseau d'actine

La suite des travaux s'est portée sur l'effet de F1 et F2 sur la biologie de la protéine d'intérêt, PD-L1, dans les lignées LCLs et DLBCLs. Ces formulations, ainsi que le fucoïdane natif, ont induit une baisse significative de l'expression relative transcriptionnelle de PD-L1, avec un effet plus marqué dans les cellules LCLs par rapport aux cellules DLBCLs. Cette baisse transcriptionnelle pourrait être le résultat d'une inhibition par les espèces fucoïdanes des voies de signalisation (PI3k/AKT, NF- $\kappa$ B or RAS/ERK1/2) impliquées dans la surexpression de PD-L1. D'un point de vue expression protéique, la quantification des niveaux totaux de PD-L1 par western blot n'a curieusement montré aucun effet des traitements suggérant une discontinuité entre l'expression génique et protéique. En revanche, une diminution significative de l'expression membranaire de PD-L1 a été observée, particulièrement notable chez les cellules

---

LCLs qui ont un niveau basal de PD-L1 bien plus important que les DLBCLs. Concernant les candidats, là encore les formulations F1 et F2 sont les plus efficaces à réduire l'expression membranaire PD-L1 que le fucoïdane natif, **démontrant une nouvelle fois l'impact positif de générer des formulations de très bas poids moléculaires.**

Le maintien des niveaux totaux couplé à la baisse de l'expression membranaire suggèrent une perturbation du trafic cellulaire de PD-L1. Cette hypothèse a pu être vérifiée grâce à des expériences supplémentaires en microscopie confocale qui ont révélé une perturbation du réseau cellulaire de  $\beta$ -actine, altérant le processus d'externalisation membranaire de PD-L1 *via* les lysosomes sécrétoires. Le mode d'action des fucoïdanes à l'origine de cet effet n'a pas encore été confirmé et il est difficile de savoir s'il provient d'une interaction membranaire ou une action intracellulaire. Cependant, des résultats préliminaires ont déjà montré une forte internalisation des candidats F1 et F2, contrairement au fucoïdane natif qui ne semble pas avoir cette capacité.

Si l'effet immunomodulateur des fucoïdanes et leurs dérivés sur PD-L1 a déjà été décrits dans plusieurs types de cancers solides, ce travail permettait de reporter pour la première fois un effet immunomodulateur dans le cas de lymphomes B associés à l'EBV, appuyés par de premières données sur les mécanismes d'action.

#### 2.4. Structure-fonction et comparaison des résultats

À la lumière des résultats, les formulations F1 et F2 sont dotées d'une bien meilleure efficacité d'action cytotoxique par rapport au fucoïdane natif (*Fucus vesiculosus*), celle-ci s'accompagnant d'une baisse de l'expression membranaire de PD-L1. Comme ces formulations sont de tBPM (DP=3,4–3,5) et issus d'une hydrolyse prolongée, nous avons souhaité nous assurer que les effets thérapeutiques observés ne provenaient pas simplement du monomère de L-Fucose (constituant majeur du PS natif). **Les expériences sur les effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques, ainsi que l'effet sur la surexpression de PD-L1, ont donc été répétées en traitant les cellules avec du L-fucose et les résultats n'ont montré aucun effet, confirmant ainsi l'originalité des formulations F1 et F2.** Cela appuie **1)** l'importance de DP par rapport aux monosaccharides seuls, et/ou **2)** de la sulfatation résiduelle (détectée par MS) **3)** l'importance de la présence d'autres monosaccharides minoritaires du fucoïdane (acide glucuronique, xylose, glucose, etc) dans ces chaînes courtes (non caractérisées ici), et/ou **4)** l'impact bénéfique possible des modifications de la structure primaire (par exemple création de

lactones) durant la dépolymérisation par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , créant ainsi des formulations bioactives contre les lymphomes B.

À ce stade des travaux, et nous questionnant sur le critère « sucre-dépendant » des effets observés, nous avons donc répété l'expérience de l'expression membranaire de PD-L1 en traitant les cellules LCLs avec un  $\lambda$ -CO\_1 d'un  $M_n$  de 1,2 kDa et d'un DS de 17,8%, à une concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (pendant 48h). Les résultats n'ont montré aucun effet significatif (**Annexe 6**), confirmant ainsi que ces effets thérapeutiques sur les cellules de lymphomes B sont bien sucre-dépendant.

Par ailleurs, de manière intéressante, nous remarquons qu'à travers cette étude la forte diminution du  $M_n$  a permis d'obtenir de meilleurs effets, ce qui rejoint plusieurs études rapportant généralement un meilleur effet anti-cancéreux des F-Os de BPM dans le cancer. De plus, la désulfatation n'a pas eu l'air d'impacter les effets bénéfiques des tBPM-F de l'étude.

L'ensemble de ces résultats obtenus à partir de formulations de F-Os démontrent bien que leur efficacité anti-cancéreuse est « polypharmacologique » dans deux contextes cancéreux différents (un cancer solide et un cancer liquide), et qu'un ajustement judicieux du couple  $M_n/\text{DS}$  de ces formulations pourrait orienter vers de meilleures pharmaco-régulations.

Ces résultats indiquent que :

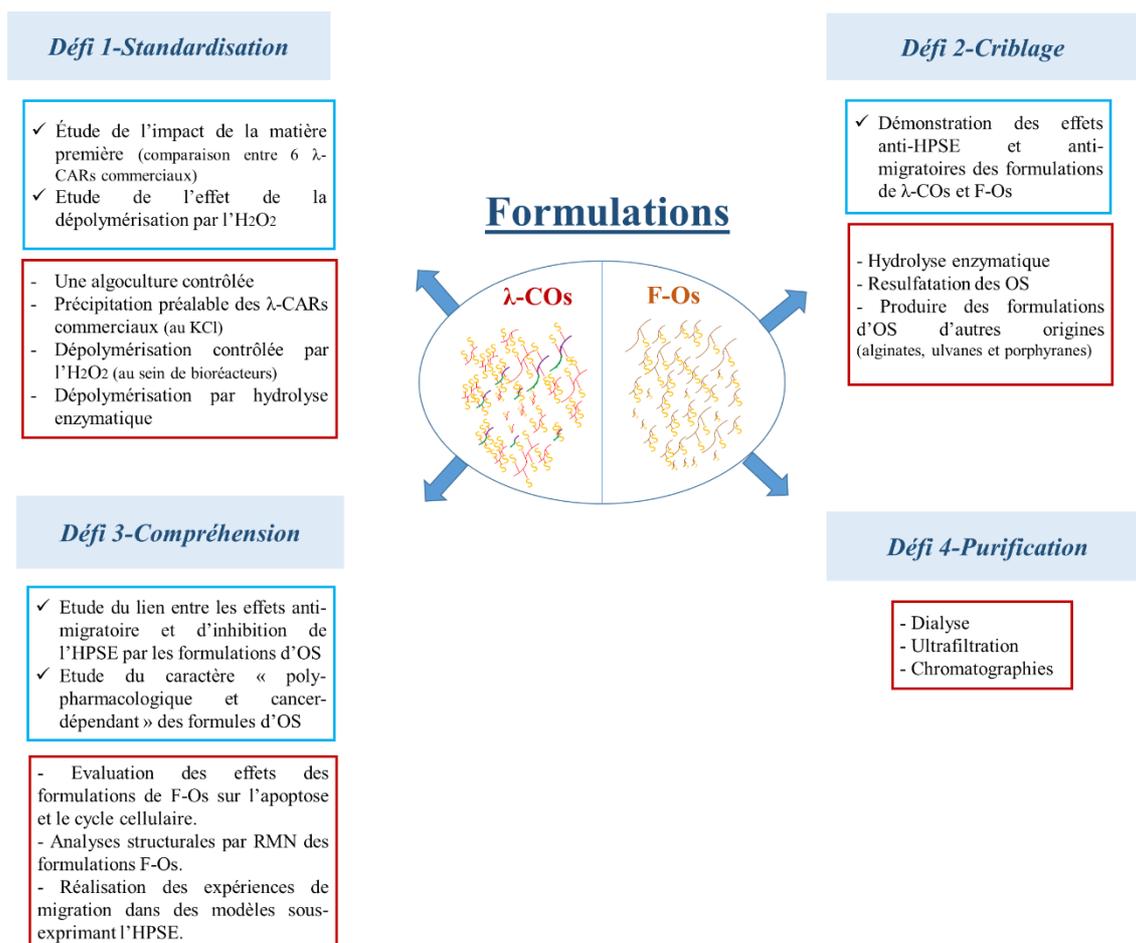
- Des formulations **de tBPM-F** ont des **meilleurs effets anti-tumoraux sur des cellules B en latence III de l'EBV ou DLBCLs que le fucoïdane natif** : rôle prometteur de ces formulations originales en tant qu'adjuvant pour potentialiser les immunothérapies anti-PD-L1.
- **Synergie possible de cet effet avec une action cytotoxique sélective sur les cellules cancéreuses.**

## **Partie 4 : Conclusions générales et perspectives**



L'étude bibliographique menée durant ces travaux a montré que les fonctions anti-tumorales portées par les OS d'origine algale peuvent s'exercer par des mécanismes communs aux chimiothérapies (anti-prolifératifs et pro-apoptotiques), tout en restant moins toxiques pour les cellules normales. Elles peuvent aussi s'exercer par le ciblage du MET en modulant plusieurs de ses acteurs clés comme l'HPSE (en inhibant son activité enzymatique ou en régulant son expression), les facteurs de croissance (en interagissant avec) ou encore les facteurs de la réponse immune (en régulant leur expression).

La translation vers la clinique de ces OS anti-tumoraux, obtenus le plus souvent par une dépolymérisation du PS natif, fait face à plusieurs obstacles. Comme le résume la **Figure 32**, ces obstacles que nous avons identifiés et rassemblés dans quatre défis de recherche majeurs, ont constitué la base de ces travaux et de leurs stratégies visant à **la conception et l'optimisation de  $\lambda$ -COs et de F-Os à visée anti-cancéreuse**.



**Figure 32.** Schéma récapitulatif des défis traités durant les travaux de thèse (cadres bleus), et de quelques exemples de perspectives envisageables (cadres rouges).

Trois de ces défis ont pu être relevés, comme suit :

### ***Défi 1- Standardisation***

L'hétérogénéité structurale des OS obtenus par une dépolymérisation du PS natif est à la fois liée à l'ensemble des facteurs constitutifs du PS natif algal (conditions culturelles, cycle de reproduction, méthodes d'extraction et de purification, etc), mais aussi, au type d'hydrolyse utilisée, impactant la composition de ceux-ci. Ainsi, pour contribuer à relever ce premier défi, une étude comparative d'OS produits par dépolymérisation radicalaire au  $H_2O_2$  à partir de six sources de  $\lambda$ -CARs natifs commerciaux a été menée, d'une part. D'autre part, afin de mieux comprendre si la méthode de dépolymérisation pourrait induire une certaine hétérogénéité des formulations d'OS produites, le ratio  $H_2O_2$ /fucoïdane natif a été modulé lors de la production de F-OS. Les résultats ont montré que :

- Les produits commerciaux de  $\lambda$ -CARs natifs présentaient des différences importantes dans leurs caractéristiques moléculaires de base (en termes de  $M_n$ ,  $D$  et de DS), dans leurs compositions élémentaires, dans la présence de différents types de CARs ( $\kappa$ -,  $\iota$ -,  $\nu$ -) à proportions variables, mais également, dans le cas de deux produits, dans l'ajout d'un additif de base glucose.
- Ces différences se répercutent dans la composition des formulations d'OS produits et dans leurs capacités à inhiber l'activité enzymatique de l'HPSE, même avec des  $M_n$  et DS similaires, prouvant par ailleurs que ces deux paramètres à eux seuls ne suffisent pas à définir que des formulations sont identiques.
- La dépolymérisation des six  $\lambda$ -CARs et du fucoïdane natif par l' $H_2O_2$  a induit une diminution du  $M_n$  et une désulfatation au cours du temps, en générant des formulations contenant des structures de motifs atypiques différentes du produit natif de départ (altération des sucres), augmentant ainsi l'hétérogénéité des formulations. Cependant, l'impact de ces structures atypiques (lactones, polyols, etc) sur les bioactivités étudiées n'a pas pu faire l'objet d'une étude approfondie dans ce travail.

- Les analyses structurales des formulations de F-OS obtenues par UPLC-MS et FT-IR n'ont pas permis de révéler, qu'utiliser des ratios différents en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/fucoïdane natif, pouvait limiter l'hétérogénéité créée par la méthode de dépolymérisation au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Il est tout à fait possible d'obtenir des formulations de BPM de M<sub>n</sub>, Đ et DS proches quel que soit le PS natif utilisé, à condition de réaliser un suivi en temps réel de la réaction de dépolymérisation (de l'évolution du M<sub>n</sub>) par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Il est donc bien clair que les variations identifiées dans des produits natifs commerciaux ont des répercussions sur les bioactivités des OS produits. Il est également évident que ces formulations de BPM préparées à partir de ces PS commerciaux formeront toujours un mélange hétérogène notamment lorsqu'il s'agit de λ-CARs natifs. Par conséquent, la présence de ces différentes espèces au sein d'un même mélange, multiplie les possibilités et les hypothèses quant à leur mode d'action (notamment quand il s'agit de vouloir comprendre les modes d'actions exercés par chaque type séparément, **voir par la suite**).

Dans le cadre de ce premier défi, et dans l'objectif de limiter au mieux cette hétérogénéité liée à la fois au PS natif et à la méthode de dépolymérisation, les **perspectives** suivantes sont envisageables :

- La mise en place d'approches d'algoculture dans des conditions contrôlées. Dans le cas des algues rouges, certaines études ont réalisé des extractions de λ-CARs à partir des algues rouges de formes tétrasporophytes, montrant la possibilité de distinguer celles-ci des formes gamétophytes [111,194,295,296]. Cela permettait de limiter dès le départ cette hétérogénéité liée à la présence de différents types de CARs.
- La mise en place de processus de pré-purification des PS natifs. Par exemple, dans le cas des λ-CARs natifs commerciaux ou extraits d'algues, il est possible de réaliser une étape de précipitation au KCl afin de séparer les types λ- (fraction non gélifiante) des κ- (fraction gélifiante). Si les recherches pharmaceutiques confirment le potentiel des λ-COs, une telle étape serait relativement simple à mettre en œuvre à l'échelle industrielle, ce qui, à terme, pourrait inciter à un changement de pratique chez les industriels producteurs de λ-CARs.

- La réalisation d'une dépolymérisation avec un ratio plus élevé d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/fucoïdane natif (par exemple : 1,5), pourrait permettre de comprendre d'avantage le lien entre le taux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la création d'espèces atypiques dans les formulations d'OS. Cela pourrait confirmer nos résultats préliminaires qui montrent que le taux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> influence uniquement la cinétique de génération des OS, sans influencer la quantité d'espèces d'OS atypiques de même M<sub>n</sub> et DS.
- L'amélioration de la méthode de dépolymérisation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mettant en œuvre, par exemple dans des bioréacteurs. Ces derniers offrent des conditions plus contrôlées notamment en termes de température, et permettent ainsi d'avoir une bonne reproductibilité du temps de réaction entre les lots d'OS produits. D'autres méthodes plus spécifiques pourraient également être utilisées telle que l'hydrolyse enzymatique par des λ-carraghénases et des fucoïdanases, qui permettrait d'une part de préserver la structure initiale du sucre (motif saccharidique et DS), et d'autre part d'assurer une homogénéité en termes de M<sub>n</sub>. En ce sens, l'arrivée des λ-carraghénases sur le marché pourrait être un vrai levier. Néanmoins, l'interrogation perdure si les effets bioactifs de ces formulations OS seront améliorés par rapport à ceux générés par l'hydrolyse radicalaire produisant les motifs atypiques (**voir ci-après défi 2- Criblage**).

## ***Défi 2- Criblage***

Dans la maturation des OS d'origine algale de fonction anti-tumorale, le défi 2 représente l'effort de recherche à poursuivre quant à l'identification de nouvelles formulations d'OS (associée à une méthode de dépolymérisation et à des paramètres réactionnels précis) capables d'agir contre une cible d'intérêt, ici **l'activité enzymatique de l'HPSE**. Dans notre premier travail, nous avons pu progresser dans la compréhension des activités anti-HPSE de formulations d'OS de différents types de CARs. Puis, le cœur de nos travaux s'est centré sur des formulations d'OS dérivés du fucoïdane natif commercial produit par l'espèce *Fucus vesiculosus*. Les résultats ont montré que :

- Dans les formulations de λ-COs, la présence du type λ- semble contribuer significativement à l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE. Le type ι- peut également générer des formulations d'OS avec une bonne activité, contrairement au

type  $\kappa$ -, prouvant que cette inhibition est « sucre-dépendante » même au sein d'une même famille avec des structures relativement proches.

- Les F-Os représentent également des inhibiteurs potentiels de l'activité enzymatique HPSE (mesurée *in vitro*), bien que celle-ci soit inférieure à celle du fucoïdane natif. À des valeurs de  $M_n$  et de DS plus ou moins proches, les  $IC_{50}$  des F-Os sont dans la même gamme de valeurs de concentrations que celles des  $\lambda$ -COs, et des héparines de BPM [58]. Par comparaison avec le suivi des activités anti-HPSE des F-Os, les résultats ont montré également que l'inhibition de cette activité par les  $\lambda$ -COs semblerait moins sulfate-dépendante. En parallèle, la dépolymérisation diminue l'activité anti-coagulante des F-Os qui devient pratiquement inexistante passé le seuil de 5 kDa, favorisant ainsi une application en oncologie.

Il est possible d'améliorer ce criblage par la mise en œuvre des **perspectives** suivantes :

- La réalisation d'un criblage de formulations d'OS issues d'un  $\lambda$ -CAR pur (obtenues par exemple grâce à la technique de précipitation au KCl). Elle permettrait de réellement achever notre étude structure-fonction basée sur l'activité anti-HPSE des espèces prédominantes de CARs, qui est pour l'instant limitée au  $\kappa$ -CAR et au  $\iota$ -CAR purs, et aux formulations de  $\lambda$ -CAR en mélange.
- L'application d'une méthode de dépolymérisation plus spécifique de la structure de base du polymère natif, préservant à la fois cette structure et ne désulfatant pas, comme une méthode enzymatique, permettrait de faciliter les études de structure-fonction, et idéalement d'améliorer les bioactivités recherchées. Elle permettrait aussi de confirmer si les structures atypiques générées par la dépolymérisation radicalaire sont à l'origine ou non des bioactivités observées. Ainsi, réévaluer les activités anti-HPSE des  $\lambda$ -COs (purs),  $\kappa$ -COs,  $\iota$ -COs, des F-Os, et de l'héparine de BPM, obtenus par une hydrolyse enzymatique, et comparer les résultats des analyses de « docking » entre les fucoïdanes (en cours), l'héparine (en cours), et les  $\lambda$ -CARs, permettrait de conclure définitivement sur la notion de « sucre-dépendant », et de pouvoir sélectionner le meilleur OS d'origine algale, inhibiteur de l'HPSE.

- La réaction de dépolymérisation par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est efficace pour induire une diminution du  $M_n$ , mais malheureusement elle induit également une diminution du DS. Ces deux facteurs étant déterminants pour l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE, cela reste difficile de comprendre si les différences d'effets observés dépendent plus de l'un ou de l'autre. Réaliser une sur-sulfatation des OS [55,162,297,298], permettrait de conclure quant à l'importance de chacun d'eux, tout en gardant la présence de motifs atypiques, potentiellement impliqués également dans les bioactivités.
- À plus long terme, il serait intéressant d'élargir le criblage vers d'autres PS d'origine algale. Par exemple, les laminarines natives (extraits des algues brunes) sulfatées par une réaction chimique, de PM ( $\approx 10$  kDa) correspondant déjà à des OS, ont été décrits pour leur efficacité à inhiber l'activité enzymatique de l'HPSE [297,299]. Également, les ulvanes (extraits des algues vertes) et les porphyranes (extraits des algues rouges), sont des PS sulfatés décrits pour avoir des activités anti-cancéreuses [23], mais le lien avec l'HPSE n'a jamais encore été établi.

### ***Défi 3-Compréhension***

Afin de relever le défi lié à la compréhension des modes d'action des formulations de  $\lambda$ -COs et de F-Os, il a été important **d'examiner la pertinence d'un crible monophénotypique *in vitro*, basé sur l'unique mesure de l'activité anti-HPSE des oligosaccharides produits**, pour prédire des effets sur des modèles cellulaires plus avancés.

Cette question a été adressée au travers d'expériences visant à discuter **les aspects de « contexte pathologique-dépendant »** et de **« poly-pharmacologie » des formulations d'OS**. Les résultats ont montré que :

- Les formulations de F-Os de la série 0,15 n'avaient d'effet sur la viabilité des cellules cancéreuses MDA-MB-231, contrairement à certaines formulations (1700 -13000 Da) de la série 0,5 (à 100  $\mu\text{g/mL}$ ).
- Au sein de notre « oligothèque » de F-Os, des activités anti-migratoires sur la lignée MDA-MB-231, allant de 59 à 90 % ont été observées (à 100  $\mu\text{g/mL}$  pour la série 0,15 ;

à 25 µg/mL pour la série 0,5). Le meilleur effet a été obtenu avec le F-O de 1215 Da (DS= 22 %) de la série 0,15.

- Dans le cas des formulations de λ-COs, l'activité anti-migratoire testée sur les cellules d'hépatocarcinome Huh7 (à 100 µg/mL) semble également être liée à la présence des types ι- et κ-. Le meilleur effet (modéré) de 26 % a été obtenu avec la formulation λ-CO\_1 de 1,2 kDa (DS= 14%).
- Les formulations de F-Os et de λ-COs pour lesquelles les activités anti-migratoires étaient les plus efficaces testées sur les cellules MDA-MB-231 et Huh7, respectivement, n'étaient pas les plus efficaces pour inhiber l'activité enzymatique de l'HPSE *in vitro*. Il est difficile de discriminer si les effets anti-migratoires observés proviennent d'une inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE ou sont le résultat de mécanismes distincts, tels qu'une régulation des niveaux transcriptionnels et protéiques [58], une interaction avec des facteurs de croissance du MET [42,254] ou autres. Nos premières hypothèses confirment que les interactions préférentielles en milieu complexe (cellulaire) de ces formulations d'OS ne semblent pas être une conséquence d'une unique interaction avec l'HPSE. Ils nous amènent à conclure qu'une inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE n'est pas suffisante pour réguler efficacement la migration de cellules cancéreuses de ce type.
- Les effets obtenus pour une formulation de λ-COs sur la migration des MDA-MB-231[48,58] ont pu être comparés aux résultats acquis avec les Huh-7. Les différences apparentes sur cette fonction entre deux types cellulaires cancéreux, renforcent le caractère « contexte pathologique-dépendant » attendu.
- De manière intéressante, des formulations de F-Os de PM intermédiaire issus de la série 0,5 (1700 -13000 Da) ont à la fois montré un effet cytotoxique sur les MDA-MB-231 (à 100 µg/mL) et une activité anti-migratoire sur les MDA-MB-231 (à 25 µg/mL). De la même manière, dans le cadre des lymphomes B, des formulations d'oligofucoïdanes de tBPM-F (F1 : 604 Da, F2 : 562 Da), ont présenté des effets anti-tumoraux à la fois *via* un effet pro-apoptotique et *via* la régulation du récepteur PD-L1. Par conséquent, il

est possible de conclure qu'effectivement, nos formulations de F-Os peuvent être « poly-pharmacologiques » dans deux modèles cancéreux différents.

Afin d'approfondir encore plus la compréhension des modes d'actions des  $\lambda$ -COs et des F-Os, les **perspectives** suivantes pourraient être appliquées :

- Compléter les analyses structurales des formulations de F-Os, obtenues par UPLC-MS et FT-IR, par des analyses en RMN afin de pouvoir tirer des conclusions plus robustes sur les différences d'effets observées entre les séries.
- L'évaluation des effets des formulations de F-Os obtenues dans la série 0,5 sur l'apoptose et le cycle cellulaire permettra de mieux comprendre par quels mécanismes s'exerce l'effet anti-métabolique observé.
- Tout comme les perspectives associées au défi 2, il faudrait reproduire des formulations de  $\lambda$ -COs par dépolymérisation par l' $H_2O_2$  mais à partir d'un  $\lambda$ -CAR purifié (par une précipitation au KCl), suivie d'une purification de ces OS. En réévaluant les activités anti-HPSE, on pourrait s'attendre à avoir une meilleure inhibition en présence des solutions pures en type  $\lambda$ -, par rapport à une formulation de  $\lambda$ -COs contenant d'autres types de CARs. Parallèlement, en évaluant de nouveaux l'activité anti-migratoire de ces formulations plus homogènes, sur les cellules Huh7 et MDA-MB-231, nous pourrions mieux interpréter si, les effets anti-cancéreux observés dans les formulations de  $\lambda$ -COs non purifiées, sont le résultat d'une synergie entre les effets des trois types de COs constituant ces formulations ou de l'activité d'un type en particulier.
- La comparaison des effets des candidats sur la migration cellulaire sur des cellules MDA-MB-231 et Huh7 sous exprimant l'HPSE (modèles sh) pourrait être réalisée. De plus, d'autres tests fonctionnels pourraient être envisagés comme ceux permettant de suivre spécifiquement le clivage de l'HS résultant de l'activité enzymatique de HPSE. Cela pourrait donner plus d'indications supplémentaires pour savoir si le mode d'action des activités anti-migratoires passe par une inhibition de l'activité enzymatique de HPSE ou par d'autres voies biologiques.

- La compréhension du mode d'action des  $\lambda$ -COs et des F-Os à l'échelle cellulaire : agissent-ils consécutivement après leur interaction avec des récepteurs présents à la surface membranaire, sont-ils internalisés, vont-ils au noyau ? Pour ce faire, des fluorochromes capables de marquer ces OS ou bien des anticorps monoclonaux les reconnaissant permettraient de suivre leur trafic cellulaire [152,153,288].
- Enfin, comme les formulations de  $\lambda$ -COs et les F-Os sont « poly-pharmacologiques » et « contexte pathologique-dépendant », il est clair que si, les criblages *in vitro* anti-HPSE restent d'intérêt, il apparaîtrait plus judicieux dans un contexte oncologique de réaliser d'abord les criblages sur la base de tests *in cellulo* sur un nombre important de lignées cancéreuses et de tests différents (cytotoxicité, migration, invasion, angiogenèse, modèle sphéroïdes etc). En ce sens, il serait d'intérêt de s'appuyer sur les grandes infrastructures de recherche et sur leurs offres de plateforme de criblage haut-débit. Ce ne serait que sur les « hits » à l'issue de cette étape, que des expériences d'identification des cibles d'interactions pourraient être réalisées, impliquant potentiellement l'HPSE dans les effets anti-tumoraux.

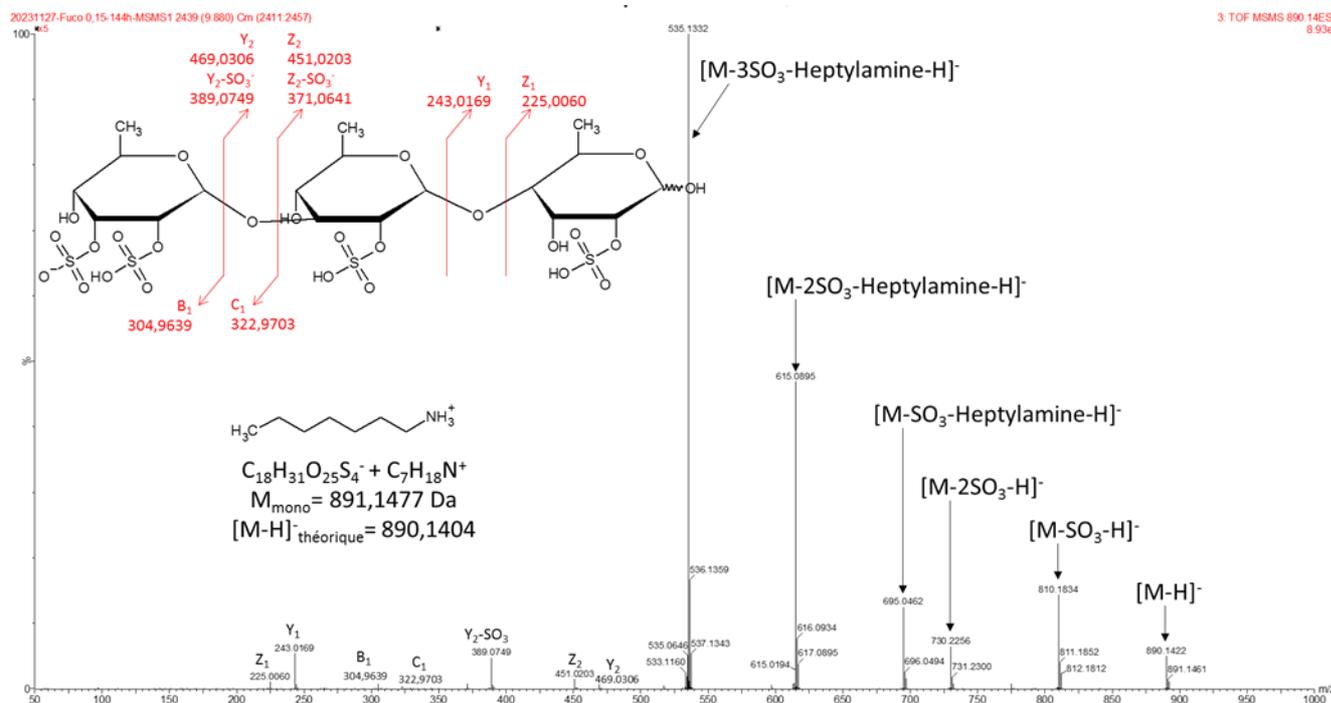
#### ***Défi 4- Purification***

Ce quatrième défi, lié à la nécessaire purification des formulations d'OS en vue de leur transfert vers la clinique, n'a pas pu être traité dans le cadre de ce travail doctoral mais fera l'objet de travaux à venir, notamment par l'application de processus simples de purification (dialyse, ultrafiltration) combinés à des méthodes de chimie séparative (HPLC gel filtration, HPLC échangeuses d'ions ou encore l'électrophorèse capillaire, etc). La mise en place de ces processus reste indispensable dans le cadre de la conception de formulations d'OS répondant aux BPF et BPL de la clinique en termes de qualité, standardisation ou de reproductibilité [44,45]. Elle contribuera aussi fortement la résolution des défis 2 et 3, avec des tests *in vitro* et des criblages *in cellulo* sur des espèces beaucoup plus pures et non sur des formulations de mélanges qui multiplie exponentiellement les hypothèses.

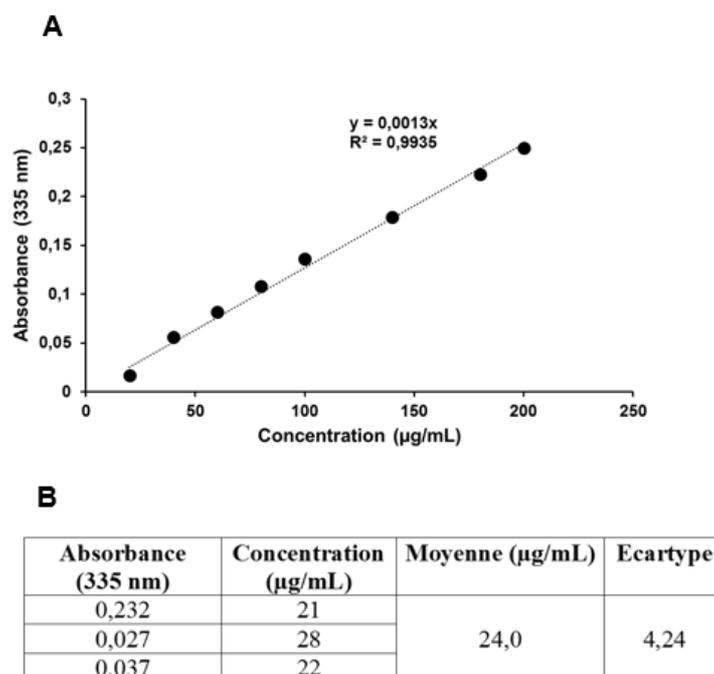


## **Annexes**

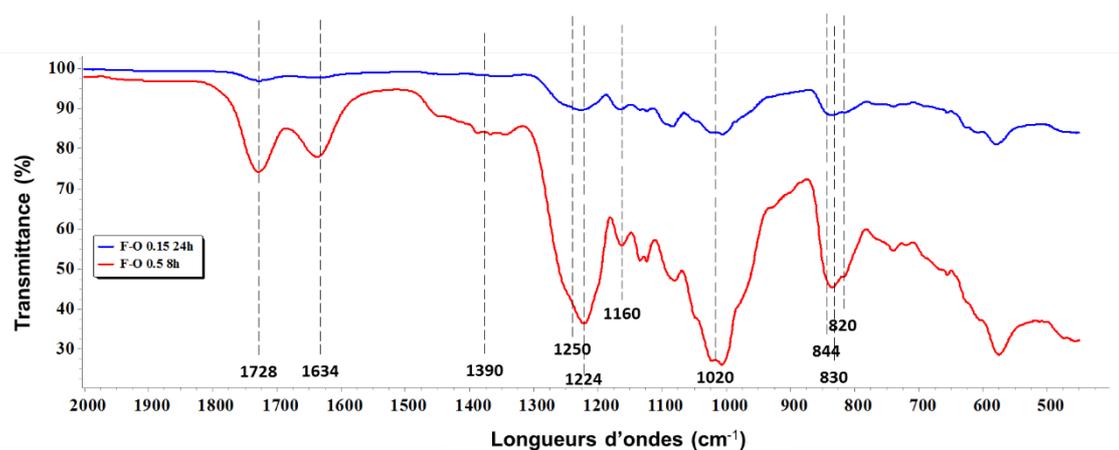




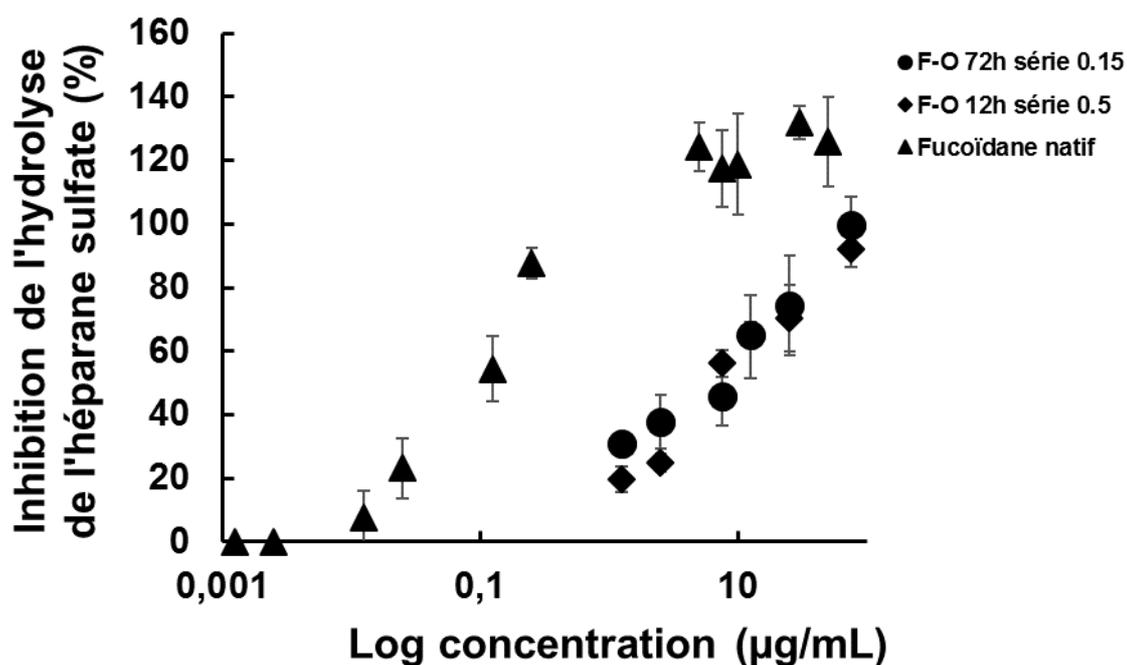
**Annexe 1.** Spectre MS/MS de l'ion 890,1303 à un  $t_r = 9'9$  correspondant à un trifucose tetrasulfaté.



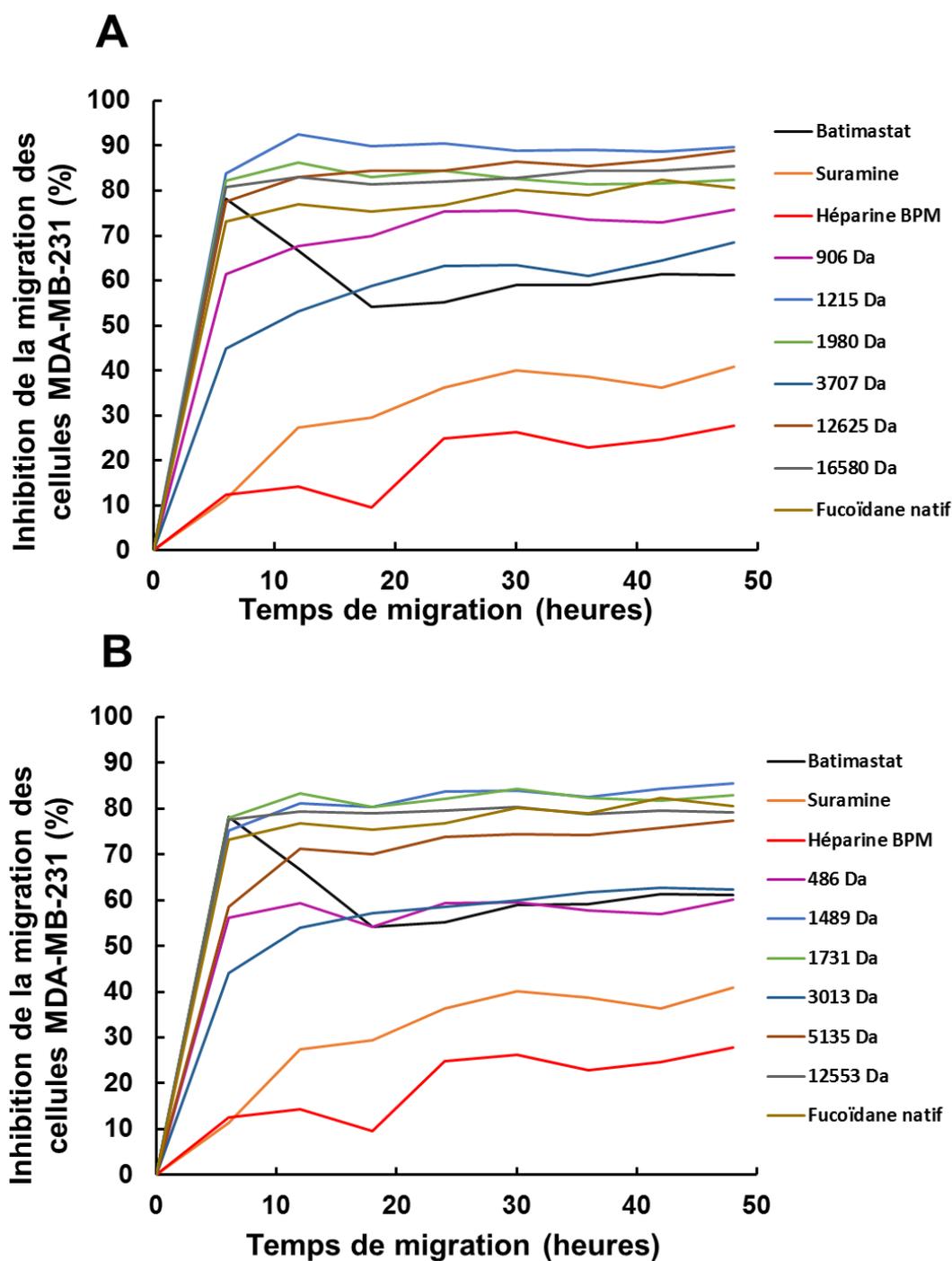
**Annexe 2.** Dosage des amines libres dans la solution de fucoidane natif par le test colorimétrique d'acide sulfonique 2,4,6-Trinitrobenzène (TNBS). (A) Courbe d'étalonnage et (B) tableau du résultat



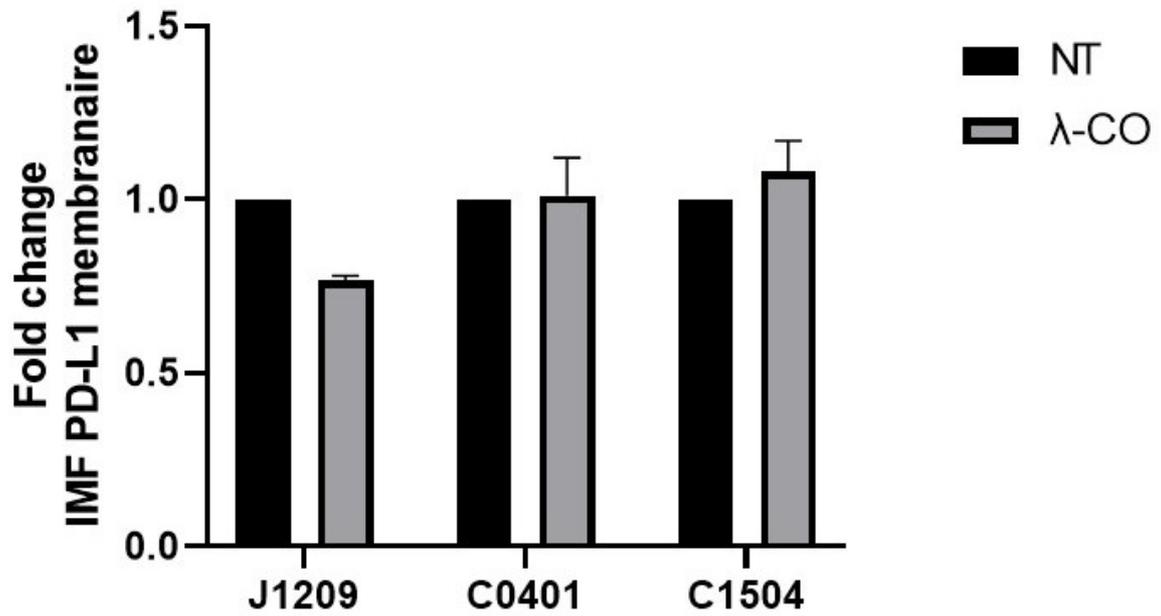
**Annexe 3.** Comparaison des spectres FTIR des formulations de F-O 24h et de F-O 8h des séries 0,15 et 0,5 ; respectivement.



**Annexe 4.** IC<sub>50</sub> de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'HPSE par la formulation de F-Os 72h de la série 0,15, la formulation de F-O 12h de la série 0,5, et par le fucoïdane natif.



**Annexe 5.** Pourcentage d'inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231 par les formulations de F-Os (**A**) de la série 0,15 (à 100 µg/mL) et (**B**) de la série 0,5 (à 25 µg/mL), et du fucoidane natif, en fonction du temps de migration. Le batimastat, la suramine, et l'héparine de BPM ont été utilisés comme contrôles positifs.



**Annexe 6.** Effet du traitement par le  $\lambda$ -CO (à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pendant 48h) sur l'expression membranaire de PD-L1 par les lymphocytes B en latence III de l'EBV.

## Références bibliographiques



1. Mattiuzzi, C.; Lippi, G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*, **2019**, *9*, 217–222, doi:10.2991/jegh.k.191008.001.
2. Chakraborty, S.; Rahman, T. The Difficulties in Cancer Treatment. *Ecancermedicalscience*, **2012**, *6*, ed16, doi:10.3332/ecancer.2012.ed16.
3. Devlin, E.J.; Denson, L.A.; Whitford, H.S. Cancer Treatment Side Effects: A Meta-Analysis of the Relationship Between Response Expectancies and Experience. *J Pain Symptom Manage*, **2017**, *54*, 245-258.e2, doi:10.1016/j.jpainsymman.2017.03.017.
4. Zhao, Y.; Adjei, A.A. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist* **2015**, *20*, 660–673, doi:10.1634/theoncologist.2014-0465.
5. Ganesh, K.; Massagué, J. Targeting Metastatic Cancer. *Nat Med*, **2021**, *27*, 34–44, doi:10.1038/s41591-020-01195-4.
6. Hentati, F.; Tounsi, L.; Djomdi, D.; Pierre, G.; Delattre, C.; Ursu, A.V.; Fendri, I.; Abdelkafi, S.; Michaud, P. Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. *Molecules*, **2020**, *25*, 3152, doi:10.3390/molecules25143152.
7. Fedorov, S.N.; Ermakova, S.P.; Zvyagintseva, T.N.; Stonik, V.A. Anticancer and Cancer Preventive Properties of Marine Polysaccharides: Some Results and Prospects. *Marine Drugs*, **2013**, *11*, 4876–4901, doi:10.3390/md11124876.
8. Nigam, S.; Singh, R.; Bhardwaj, S.K.; Sami, R.; Nikolova, M.P.; Chavali, M.; Sinha, S. Perspective on the Therapeutic Applications of Algal Polysaccharides. *J Polym Environ*, **2021**, doi:10.1007/s10924-021-02231-1.
9. García Tasende, M.; Manriquez-Hernandez, J. Carrageenan Properties and Applications: A Review. In *Carrageenans: Sources and Extraction Methods, Molecular Structure, Bioactive Properties and Health Effects*; **2016**; pp. 17–50 ISBN 978-1-63485-503-7.
10. Miao, T.; Wang, J.; Zeng, Y.; Liu, G.; Chen, X. Polysaccharide-Based Controlled Release Systems for Therapeutics Delivery and Tissue Engineering: From Bench to Bedside. *Adv Sci (Weinh)*, **2018**, *5*, 1700513, doi:10.1002/advs.201700513.
11. Stiger-Pouvreau, V.; Bourgougnon, N.; Deslandes, E. Chapter 8 - Carbohydrates From Seaweeds. In *Seaweed in Health and Disease Prevention*; Fleurence, J., Levine, I., Eds.; Academic Press: San Diego, **2016**; pp. 223–274 ISBN 978-0-12-802772-1.

12. Muthukumar, J.; Chidambaram, R.; Sukumaran, S. Sulfated Polysaccharides and Its Commercial Applications in Food Industries—A Review. *J Food Sci Technol*, **2021**, *58*, 2453–2466, doi:10.1007/s13197-020-04837-0.
13. Fernando, S.; Kim, K.-N.; Kim, D.; Jeon, Y.-J. Algal Polysaccharides: Potential Bioactive Substances for Cosmeceutical Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, **2018**, *39*, 1–15, doi:10.1080/07388551.2018.1503995.
14. Yao, Y.; Xu, B. Skin Health Promoting Effects of Natural Polysaccharides and Their Potential Application in the Cosmetic Industry. *Polysaccharides*, **2022**, *3*, 818–830, doi:10.3390/polysaccharides3040048.
15. Necas, J.; Bartosikova, L. Carrageenan: A Review. *Veterinarni Medicina*, **2013**, *58*, 187–205, doi:10.17221/6758-VETMED.
16. Morais, A.M.M.B.; Alves, A.; Kumla, D.; Morais, R. Pharmaceutical and Biomedical Potential of Sulphated Polysaccharides from Algae. In, **2020**, ISBN 978-3-030-35734-4.
17. Kuznetsova, T.A.; Andryukov, B.G.; Besednova, N.N.; Zaporozhets, T.S.; Kalinin, A.V. Marine Algae Polysaccharides as Basis for Wound Dressings, Drug Delivery, and Tissue Engineering: A Review. *Journal of Marine Science and Engineering*, **2020**, *8*, 481, doi:10.3390/jmse8070481.
18. Zaitseva, O.O.; Sergushkina, M.I.; Khudyakov, A.N.; Polezhaeva, T.V.; Solomina, O.N. Seaweed Sulfated Polysaccharides and Their Medicinal Properties. *Algal Research*, **2022**, *68*, 102885, doi:10.1016/j.algal.2022.102885.
19. Kang, J.; Jia, X.; Wang, N.; Xiao, M.; Song, S.; Wu, S.; Li, Z.; Wang, S.; Cui, S.W.; Guo, Q. Insights into the Structure-Bioactivity Relationships of Marine Sulfated Polysaccharides: A Review. *Food Hydrocolloids*, **2022**, *123*, 107049, doi:10.1016/j.foodhyd.2021.107049.
20. Lee, Y.-E.; Kim, H.; Seo, C.; Park, T.; Lee, K.B.; Yoo, S.-Y.; Hong, S.-C.; Kim, J.T.; Lee, J. Marine Polysaccharides: Therapeutic Efficacy and Biomedical Applications. *Arch. Pharm. Res*, **2017**, *40*, 1006–1020, doi:10.1007/s12272-017-0958-2.
21. Patel, S. Therapeutic Importance of Sulfated Polysaccharides from Seaweeds: Updating the Recent Findings. *3 Biotech* **2012**, *2*, 171–185, doi:10.1007/s13205-012-0061-9.
22. Parish, C.R.; Coombe, D.R.; Jakobsen, K.B.; Bennett, F.A.; Underwood, P.A. Evidence That Sulphated Polysaccharides Inhibit Tumour Metastasis by Blocking Tumour-Cell-Derived Heparanases. *Int J Cancer*, **1987**, *40*, 511–518, doi:10.1002/ijc.2910400414.

- 
23. Bhuyan, P.; Nayak, R.; Patra, S.; Abdulabbas, H.; Jena, M.; Pradhan, B. Seaweed-Derived Sulfated Polysaccharides; The New Age Chemopreventives: A Comprehensive Review. *Cancers*, **2023**, *15*, 715, doi:10.3390/cancers15030715.
  24. Ishai-Michaeli, R.; Eldor, A.; Vlodaysky, I. Heparanase Activity Expressed by Platelets, Neutrophils, and Lymphoma Cells Releases Active Fibroblast Growth Factor from Extracellular Matrix. *Cell Regul*, **1990**, *1*, 833–842, doi:10.1091/mbc.1.11.833.
  25. Xie, X.-T.; Cheong, K.-L. Recent Advances in Marine Algae Oligosaccharides: Structure, Analysis, and Potential Prebiotic Activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2021**, *0*, 1–16, doi:10.1080/10408398.2021.1916736.
  26. Zhao, H.; Wu, L.; Yan, G.; Chen, Y.; Zhou, M.; Wu, Y.; Li, Y. Inflammation and Tumor Progression: Signaling Pathways and Targeted Intervention. *Sig Transduct Target Ther*, **2021**, *6*, 1–46, doi:10.1038/s41392-021-00658-5.
  27. Sakuma, Y.; Shimizu, T.; Kurosawa, Y.; Ohara, H.; Muto, Y.; Sato, Y.; Kiko, T.; Sato, A.; Misaka, T.; Yoshihisa, A.; et al. Impact of Bleeding Event for New Cancer Diagnosis in Patients with Antiplatelet Therapy after Percutaneous Coronary Intervention. *Journal of Cardiology*, **2023**, *82*, 460–466, doi:10.1016/j.jjcc.2023.04.012.
  28. Guo, Z.; Wei, Y.; Zhang, Y.; Xu, Y.; Zheng, L.; Zhu, B.; Yao, Z. Carrageenan Oligosaccharides: A Comprehensive Review of Preparation, Isolation, Purification, Structure, Biological Activities and Applications. *Algal Research*, **2022**, *61*, 102593, doi:10.1016/j.algal.2021.102593.
  29. Wang, M.; Veeraperumal, S.; Zhong, S.; Cheong, K.-L. Fucoidan-Derived Functional Oligosaccharides: Recent Developments, Preparation, and Potential Applications. *Foods*, **2023**, *12*, 878, doi:10.3390/foods12040878.
  30. Courtois, J. Oligosaccharides from Land Plants and Algae: Production and Applications in Therapeutics and Biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, **2009**, *12*, 261–273, doi:10.1016/j.mib.2009.04.007.
  31. Barreteau, H.; Delattre, C.; Michaud, P. Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. *Food Technology and Biotechnology*, **2005**.
  32. Cheong, K.-L.; Qiu, H.-M.; Du, H.; Liu, Y.; Khan, B.M. Oligosaccharides Derived from Red Seaweed: Production, Properties, and Potential Health and Cosmetic Applications. *Molecules*, **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23102451.
  33. Zhang, X.; Pagadala, V.; Jester, H.M.; Lim, A.M.; Pham, T.Q.; Goulas, A.M.P.; Liu, J.; Linhardt, R.J. Chemoenzymatic Synthesis of Heparan Sulfate and Heparin Oligosaccharides
-

---

and NMR Analysis: Paving the Way to a Diverse Library for Glycobiologists. *Chem. Sci*, **2017**, *8*, 7932–7940, doi:10.1039/C7SC03541A.

34. Trincone, A. Molecular Fishing: Marine Oligosaccharides. *Frontiers in Marine Science*, **2014**, *1*.

35. Zhu, B.; Ni, F.; Xiong, Q.; Yao, Z. Marine Oligosaccharides Originated from Seaweeds: Source, Preparation, Structure, Physiological Activity and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2021**, *61*, 60–74, doi:10.1080/10408398.2020.1716207.

36. Turrini, E.; Maffei, F.; Fimognari, C. Ten Years of Research on Fucoidan and Cancer: Focus on Its Antiangiogenic and Antimetastatic Effects. *Mar Drugs*, **2023**, *21*, 307, doi:10.3390/md21050307.

37. Rhein-Knudsen, N.; Ale, M.; Ajalloueiian, F.; Yu, L.; Meyer, A. Rheological Properties of Agar and Carrageenan from Ghanaian Red Seaweeds. *Food Hydrocolloids*, **2017**, *63*, 50–58, doi:10.1016/j.foodhyd.2016.08.023.

38. H.P.S, A.K.; Lai, T.K.; Tye, Y.; Rizal, S.; Chong, E.; Yap, S.W.; Hamzah, A.; Fazita, M.; M. Tahir, P. A Review of Extractions of Seaweed Hydrocolloids: Properties and Applications. *Express Polymer Letters*, **2018**, *12*, 296–317, doi:10.3144/expresspolymlett.2018.27.

39. Thiviya, P.; Gamage, A.; Liyanapathirana, A.; Makehelwala, M.; Dassanayake, R.S.; Manamperi, A.; Merah, O.; Mani, S.; Koduru, J.R.; Madhujith, T. Algal Polysaccharides: Structure, Preparation and Applications in Food Packaging. *Food Chemistry*, **2023**, *405*, 134903, doi:10.1016/j.foodchem.2022.134903.

40. Gupta, D.; Silva, M.; Radziun, K.; Martinez, D.C.; Hill, C.J.; Marshall, J.; Hearnden, V.; Puertas-Mejia, M.A.; Reilly, G.C. Fucoidan Inhibition of Osteosarcoma Cells Is Species and Molecular Weight Dependent. *Mar Drugs*, **2020**, *18*, doi:10.3390/md18020104.

41. Zhu, C.; Cao, R.; Zhang, S.-X.; Man, Y.-N.; Wu, X.-Z. Fucoidan Inhibits the Growth of Hepatocellular Carcinoma Independent of Angiogenesis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**, *2013*, e692549, doi:10.1155/2013/692549.

42. Niu, T.-T.; Zhang, D.-S.; Chen, H.-M.; Yan, X.-J. Modulation of the Binding of Basic Fibroblast Growth Factor and Heparanase Activity by Purified  $\lambda$ -Carrageenan Oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **2015**, *125*, 76–84, doi:10.1016/j.carbpol.2015.02.069.

43. Zhang, Y.; Zhang, G.-L.; Sun, X.; Cao, K.-X.; Shang, Y.-W.; Gong, M.-X.; Ma, C.; Nan, N.; Li, J.-P.; Yu, M.-W.; et al. Gubenyiliu II Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis

- Associated with Decreased Heparanase Expression and Phosphorylation of ERK and AKT Pathways. *Molecules*, **2017**, *22*, 787, doi:10.3390/molecules22050787.
44. Chauvierre, C.; Aid-Launais, R.; Aerts, J.; Chaubet, F.; Maire, M.; Chollet, L.; Rolland, L.; Bonafé, R.; Rossi, S.; Bussi, S.; et al. Pharmaceutical Development and Safety Evaluation of a GMP-Grade Fucoidan for Molecular Diagnosis of Cardiovascular Diseases. *Mar Drugs*, **2019**, *17*, 699, doi:10.3390/md17120699.
45. Zayed, A.; Ulber, R. Fucoidan Production: Approval Key Challenges and Opportunities. *Carbohydrate Polymers*, **2019**, *211*, 289–297, doi:10.1016/j.carbpol.2019.01.105.
46. Endo, T.; Koizumi, S. Large-Scale Production of Oligosaccharides Using Engineered Bacteria. *Curr Opin Struct Biol*, **2000**, *10*, 536–541, doi:10.1016/s0959-440x(00)00127-5.
47. Zhou, G.; Sun, Y.; Xin, H.; Zhang, Y.; Li, Z.; Xu, Z. In Vivo Antitumor and Immunomodulation Activities of Different Molecular Weight Lambda-Carrageenans from *Chondrus Ocellatus*. *Pharmacol. Res*, **2004**, *50*, 47–53, doi:10.1016/j.phrs.2003.12.002.
48. Groult, H.; Cousin, R.; Chot-Plassot, C.; Maura, M.; Bridiau, N.; Piot, J.-M.; Maugard, T.; Fruitier-Arnaudin, I.  $\lambda$ -Carrageenan Oligosaccharides of Distinct Anti-Heparanase and Anticoagulant Activities Inhibit MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration. *Mar Drugs*, **2019**, *17*, doi:10.3390/md17030140.
49. Yang, C.; Chung, D.; Shin, I.-S.; Lee, H.; Kim, J.; Lee, Y.; You, S. Effects of Molecular Weight and Hydrolysis Conditions on Anticancer Activity of Fucoidans from Sporophyll of *Undaria Pinnatifida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2008**, *43*, 433–437, doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.08.006.
50. Li, X.; Wu, N.; Chen, Y.; Tan, J.; Wang, J.; Geng, L.; Qin, Y.; Zhang, Q. Degradation of Different Molecular Weight Fucoidans and Their Inhibition of TGF-B1 Induced Epithelial–Mesenchymal Transition in Mouse Renal Tubular Epithelial Cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2020**, *151*, 545–553, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.068.
51. Lahrsen, E.; Liewert, I.; Alban, S. Gradual Degradation of Fucoidan from *Fucus Vesiculosus* and Its Effect on Structure, Antioxidant and Antiproliferative Activities. *Carbohydrate Polymers*, **2018**, *192*, 208–216, doi:10.1016/j.carbpol.2018.03.056.
52. Anisha, G.S.; Padmakumari, S.; Patel, A.K.; Pandey, A.; Singhania, R.R. Fucoidan from Marine Macroalgae: Biological Actions and Applications in Regenerative Medicine, Drug Delivery Systems and Food Industry. *Bioengineering*, **2022**, *9*, 472, doi:10.3390/bioengineering9090472.

- 
53. Yuan, H.; Zhang, W.; Li, X.; Lü, X.; Li, N.; Gao, X.; Song, J. Preparation and in Vitro Antioxidant Activity of  $\kappa$ -Carrageenan Oligosaccharides and Their Oversulfated, Acetylated, and Phosphorylated Derivatives. *Carbohydrate Research*, **2005**, *340*, 685–692, doi:10.1016/j.carres.2004.12.026.
54. Usoltseva Menshova, R.V.; Anastyuk, S.D.; Shevchenko, N.M.; Zvyagintseva, T.N.; Ermakova, S.P. The Comparison of Structure and Anticancer Activity in Vitro of Polysaccharides from Brown Algae *Alaria Marginata* and *A. Angusta*. *Carbohydr Polym*, **2016**, *153*, 258–265, doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.103.
55. Cho, M.L.; Lee, B.-Y.; You, S.G. Relationship between Oversulfation and Conformation of Low and High Molecular Weight Fucoidans and Evaluation of Their in Vitro Anticancer Activity. *Molecules*, **2011**, *16*, 291–297, doi:10.3390/molecules16010291.
56. Zong, A.; Cao, H.; Wang, F. Anticancer Polysaccharides from Natural Resources: A Review of Recent Research. *Carbohydr Polym*, **2012**, *90*, 1395–1410, doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.026.
57. Falanga, A.; Vignoli, A.; Diani, E.; Marchetti, M. Comparative Assessment of Low-Molecular-Weight Heparins in Cancer from the Perspective of Patient Outcomes and Survival. *Patient related outcome measures*, **2011**, *2*, 175–188, doi:10.2147/PROM.S10099.
58. Cousin, R.; Groult, H.; Manseur, C.; Ferru-Clément, R.; Gani, M.; Havret, R.; Toucheteau, C.; Prunier, G.; Colin, B.; Morel, F.; et al. A Marine  $\lambda$ -Oligocarrageenan Inhibits Migratory and Invasive Ability of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells through Actions on Heparanase Metabolism and MMP-14/MMP-2 Axis. *Marine Drugs*, **2021**, *19*, 546, doi:10.3390/md19100546.
59. Zhang, Y.; Cui, L. Discovery and Development of Small-Molecule Heparanase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2023**, *90*, 117335, doi:10.1016/j.bmc.2023.117335.
60. Vlodaysky, I.; Barash, U.; Nguyen, H.M.; Yang, S.-M.; Ilan, N. Biology of the Heparanase–Heparan Sulfate Axis and Its Role in Disease Pathogenesis. *Semin Thromb Hemost*, **2021**, *47*, 240–253, doi:10.1055/s-0041-1725066.
61. Rivara, S.; Milazzo, F.M.; Giannini, G. Heparanase: A Rainbow Pharmacological Target Associated to Multiple Pathologies Including Rare Diseases. *Future Med Chem*, **2016**, *8*, 647–680, doi:10.4155/fmc-2016-0012.
62. Nasser, N.J. Heparanase Involvement in Physiology and Disease. *Cell. Mol. Life Sci*, **2008**, *65*, 1706–1715, doi:10.1007/s00018-008-7584-6.
-

- 
63. Mohan, C.D.; Hari, S.; Preetham, H.D.; Rangappa, S.; Barash, U.; Ilan, N.; Nayak, S.C.; Gupta, V.K.; Basappa; Vlodavsky, I.; et al. Targeting Heparanase in Cancer: Inhibition by Synthetic, Chemically Modified, and Natural Compounds. *iScience*, **2019**, *15*, 360–390, doi:10.1016/j.isci.2019.04.034.
64. Masola, V.; Zaza, G.; Gambaro, G.; Franchi, M.; Onisto, M. Role of Heparanase in Tumor Progression: Molecular Aspects and Therapeutic Options. *Seminars in Cancer Biology*, **2020**, *62*, 86–98, doi:10.1016/j.semcancer.2019.07.014.
65. Jayatilleke, K.M.; Hulett, M.D. Heparanase and the Hallmarks of Cancer. *J Transl Med*, **2020**, *18*, 453, doi:10.1186/s12967-020-02624-1.
66. Zhang, B.; Shi, D.; Li, M.; Shi, F.; Chi, L. A Quantitative Mass Spectrometry Method to Differentiate Bovine and Ovine Heparins from Pharmaceutical Porcine Heparin. *Carbohydrate Polymers*, **2023**, *301*, 120303, doi:10.1016/j.carbpol.2022.120303.
67. McMahon, A.W.; Pratt, R.G.; Hammad, T.A.; Kozlowski, S.; Zhou, E.; Lu, S.; Kulick, C.G.; Mallick, T.; Dal Pan, G. Description of Hypersensitivity Adverse Events Following Administration of Heparin That Was Potentially Contaminated with Oversulfated Chondroitin Sulfate in Early 2008. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, **2010**, *19*, 921–933, doi:10.1002/pds.1991.
68. Chess, E.K.; Bairstow, S.; Donovan, S.; Havel, K.; Hu, P.; Johnson, R.J.; Lee, S.; McKee, J.; Miller, R.; Moore, E.; et al. Case Study: Contamination of Heparin with Oversulfated Chondroitin Sulfate. *Handb Exp Pharmacol*, **2012**, 99–125, doi:10.1007/978-3-642-23056-1\_6.
69. Poupard, N. Conception de Polysaccharides Sulfatés Inhibiteurs de l'héparanase Pour Le Traitement de l'angiogénèse Tumorale. These de doctorat, La Rochelle, **2017**.
70. Silva, F.R.F.; Dore, C.M.P.G.; Marques, C.T.; Nascimento, M.S.; Benevides, N.M.B.; Rocha, H.A.O.; Chavante, S.F.; Leite, E.L. Anticoagulant Activity, Paw Edema and Pleurisy Induced Carrageenan: Action of Major Types of Commercial Carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, **2010**, *79*, 26–33, doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.010.
71. Saluri, K.; Tuvikene, R. Anticoagulant and Antioxidant Activity of Lambda- and Theta-Carrageenans of Different Molecular Weights. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, **2020**, *24*, 100243, doi:10.1016/j.bcdf.2020.100243.
72. Poupard, N.; Badarou, P.; Fasani, F.; Groult, H.; Bridiau, N.; Sannier, F.; Bordenave-Juchereau, S.; Kieda, C.; Piot, J.-M.; Grillon, C. Assessment of Heparanase-Mediated Angiogenesis Using Microvascular Endothelial Cells: Identification of  $\lambda$ -Carrageenan
-

- Derivative as a Potent Anti Angiogenic Agent. *Mar Drugs*, **2017**, *15*, E134, doi:10.3390/md15050134.
73. Cousin, R. Pharmaco-régulation de la progression tumorale de cancers mammaires par des oligosaccharides de lambda carraghénanes inhibiteurs d'héparanase. phdthesis, Université de La Rochelle, **2021**.
74. Baldauf, S.L. The Deep Roots of Eukaryotes. *Science*, **2003**, *300*, 1703–1706, doi:10.1126/science.1085544.
75. Michel, G.; Tonon, T.; Scornet, D.; Cock, J.M.; Kloareg, B. The Cell Wall Polysaccharide Metabolism of the Brown Alga *Ectocarpus Siliculosus*. Insights into the Evolution of Extracellular Matrix Polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol*, **2010**, *188*, 82–97, doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03374.x.
76. Lee, W.-K.; Ho, C.-L. Ecological and Evolutionary Diversification of Sulphated Polysaccharides in Diverse Photosynthetic Lineages: A Review. *Carbohydrate Polymers*, **2022**, *277*, 118764, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118764.
77. Préchoux, A. Modification Des Propriétés Physico-Chimiques Des Carraghénanes Par La Purification et Caractérisation de Carraghénane-Sulfatases. These de doctorat, Paris 6, **2012**.
78. Zhang, T.; Guo, Q.; Xin, Y.; Liu, Y. Comprehensive Review in Moisture Retention Mechanism of Polysaccharides from Algae, Plants, Bacteria and Fungus. *Arabian Journal of Chemistry*, **2022**, *15*, 104163, doi:10.1016/j.arabjc.2022.104163.
79. Shao, Z.; Duan, D. The Cell Wall Polysaccharides Biosynthesis in Seaweeds: A Molecular Perspective. *Frontiers in Plant Science*, **2022**, *13*.
80. Mohammed, A.S.A.; Naveed, M.; Jost, N. Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *J Polym Environ*, **2021**, *29*, 2359–2371, doi:10.1007/s10924-021-02052-2.
81. Ali, A.; Ahmed, S. Carrageenans: Structure, Properties and Applications. In *Marine Polysaccharides*; Jenny Stanford Publishing, **2019**, ISBN 978-0-429-05892-9.
82. Souza, H.K.S.; Kraiem, W.; Ben Yahia, A.; Aschi, A.; Hilliou, L. From Seaweeds to Hydrogels: Recent Progress in Kappa-2 Carrageenans. *Materials (Basel)*, **2023**, *16*, 5387, doi:10.3390/ma16155387.
83. Hernández-Carmona, G.; Freile-Peigrín, Y.; Hernández-Garibay, E. Conventional and Alternative Technologies for the Extraction of Algal Polysaccharides. In *Functional*

---

*Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*; Elsevier, **2013**; pp. 475–516 ISBN 978-0-85709-512-1.

84. Campo, V.L.; Kawano, D.F.; Silva, D.B. da; Carvalho, I. Carrageenans: Biological Properties, Chemical Modifications and Structural Analysis – A review. *Carrageenans. Carbohydrate Polymers*, **2009**, *77*, 167–180, doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.020.
85. Álvarez-Viñas, M.; Souto, S.; Flórez-Fernández, N.; Torres, M.D.; Bandín, I.; Domínguez, H. Antiviral Activity of Carrageenans and Processing Implications. *Mar Drugs*, **2021**, *19*, 437, doi:10.3390/md19080437.
86. Chevenier, A.; Jouanneau, D.; Ficko-Blean, E. Carrageenan Biosynthesis in Red Algae: A Review. *Cell Surf*, **2023**, *9*, 100097, doi:10.1016/j.tcs.2023.100097.
87. van de Velde, F.; Knutsen, S.H.; Usov, A.I.; Rollema, H.S.; Cerezo, A.S. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C High Resolution NMR Spectroscopy of Carrageenans: Application in Research and Industry. *Trends in Food Science & Technology*, **2002**, *13*, 73–92, doi:10.1016/S0924-2244(02)00066-3.
88. Knutsen, S.H.; Myslabodski, D.E.; Larsen, B.; Usov, A.I. A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans, **1994**, *37*, 163–170, doi:10.1515/botm.1994.37.2.163.
89. Smith, D.B.; Cook, W.H. Fractionation of Carrageenin. *Arch Biochem Biophys* **1953**, *45*, 232–233, doi:10.1016/0003-9861(53)90421-4.
90. McCandless, E.L.; Craigie, J.S. Sulfated Polysaccharides in Red and Brown Algae. *Annual Review of Plant Physiology*, **1979**, *30*, 41–53, doi:10.1146/annurev.pp.30.060179.000353.
91. Greer, C.W.; Yaphe, W. Characterization of Hybrid (Beta-Kappa-Gamma) Carrageenan from *Eucheuma Gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) Using Carrageenases, Infrared and <sup>13</sup>C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, **1984**, *27*, 473–478, doi:10.1515/botm.1984.27.10.473.
92. J. Mollion Isolation of a New Type of Carrageenan from *Rissoella Verruculosa* (Bert.) J. Ag. (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot. Mar*, **1986**, *29*, 549–552.
93. Wong, K.F.; Craigie, J.S. Sulfohydrolase Activity and Carrageenan Biosynthesis in *Chondrus Crispus* (Rhodophyceae). *Plant Physiol*, **1978**, *61*, 663–666.
94. Genicot, S.; De Ruiter, G.; Kloareg, B.; Penninkhof, B.; Potin, P.; Richard, O.; Rudolph, B. Sulfohydrolases, Corresponding Amino Acid and Nucleotide Sequences, Sulfohydrolase Preparations, Processes, and Products Thereof, **2000**.

95. Genicot-Joncour, S.; Poinas, A.; Richard, O.; Potin, P.; Rudolph, B.; Kloareg, B.; Helbert, W. The Cyclization of the 3,6-Anhydro-Galactose Ring of  $\iota$ -Carrageenan Is Catalyzed by Two d-Galactose-2,6-Sulfurylases in the Red Alga *Chondrus Crispus*. *Plant Physiol*, **2009**, *151*, 1609–1616, doi:10.1104/pp.109.144329.
96. Pereira, L. Population Studies and Carrageenan Properties in Eight Gigartinales (Rhodophyta) from Western Coast of Portugal. *The Scientific World Journal*, **2013**, e939830, doi:10.1155/2013/939830.
97. Hotchkiss, S.; Brooks, M.; Campbell, R.; Philp, K.; Trius, A. The Use of Carrageenan in Food. In *Carrageenans: Sources and Extraction Methods, Molecular Structure, Bioactive Properties and Health Effects*, **2016**; pp. 229–243.
98. Pacheco-Quito, E.-M.; Ruiz-Caro, R.; Veiga, M.-D. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications. *Mar Drugs*, **2020**, *18*, 583, doi:10.3390/md18110583.
99. Deniaud-Bouët, E.; Hardouin, K.; Potin, P.; Kloareg, B.; Hervé, C. A Review about Brown Algal Cell Walls and Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides: Cell Wall Context, Biomedical Properties and Key Research Challenges. *Carbohydr Polym*, **2017**, *175*, 395–408, doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.082.
100. Bernardi, G.; Springer, G.F. Properties of Highly Purified Fucan. *J Biol Chem*, **1962**, *237*, 75–80.
101. Black, W. a. P.; Dewar, E.T.; Woodward, F.N. Manufacture of Algal Chemicals. IV—Laboratory-Scale Isolation of Fucoidin from Brown Marine Algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1952**, *3*, 122–129, doi:10.1002/jsfa.2740030305.
102. Hoagland, D.R.; Lieb, L.L. THE COMPLEX CARBOHYDRATES AND FORMS OF SULPHUR IN MARINE ALGAE OF THE PACIFIC COAST. *Journal of Biological Chemistry*, **1915**, *23*, 287–297, doi:10.1016/S0021-9258(18)87617-7.
103. Yamamoto, R.; Nishikori, M.; Kitawaki, T.; Sakai, T.; Hishizawa, M.; Tashima, M.; Kondo, T.; Ohmori, K.; Kurata, M.; Hayashi, T.; et al. PD-1-PD-1 Ligand Interaction Contributes to Immunosuppressive Microenvironment of Hodgkin Lymphoma. *Blood*, **2008**, *111*, 3220–3224, doi:10.1182/blood-2007-05-085159.
104. Sugawara, I.; Ishizaka, S. Polysaccharides with Sulfate Groups Are Human T-Cell Mitogens and Murine Polyclonal B-Cell Activators (PBAs): I. Fucoidan and Heparin. *Cellular Immunology*, **1982**, *74*, 162–171, doi:10.1016/0008-8749(82)90016-8.

- 
105. Citkowska, A.; Szekalska, M.; Winnicka, K. Possibilities of Fucoïdan Utilization in the Development of Pharmaceutical Dosage Forms. *Mar Drugs*, **2019**, *17*, doi:10.3390/md17080458.
106. Li, B.; Lu, F.; Wei, X.; Zhao, R. Fucoïdan: Structure and Bioactivity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **2008**, *13*, 1671–1695, doi:10.3390/molecules13081671.
107. Mabate, B.; Daub, C.D.; Malgas, S.; Edkins, A.L.; Pletschke, B.I. Fucoïdan Structure and Its Impact on Glucose Metabolism: Implications for Diabetes and Cancer Therapy. *Mar Drugs*, **2021**, *19*, 30, doi:10.3390/md19010030.
108. van Weelden, G.; Bobiński, M.; Okła, K.; van Weelden, W.J.; Romano, A.; Pijnenborg, J.M.A. Fucoïdan Structure and Activity in Relation to Anti-Cancer Mechanisms. *Mar Drugs*, **2019**, *17*, doi:10.3390/md17010032.
109. Ale, M.T.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S. Important Determinants for Fucoïdan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar Drugs*, **2011**, *9*, 2106–2130, doi:10.3390/md9102106.
110. Martín-del-Campo, A.; Fermín-Jiménez, J.A.; Fernández-Escamilla, V.V.; Escalante-García, Z.Y.; Macías-Rodríguez, M.E.; Estrada-Girón, Y. Improved Extraction of Carrageenan from Red Seaweed (*Chondracanthus Canaliculatus*) Using Ultrasound-Assisted Methods and Evaluation of the Yield, Physicochemical Properties and Functional Groups. *Food Sci Biotechnol*, **2021**, *30*, 901–910, doi:10.1007/s10068-021-00935-7.
111. Calvo, G.H.; Cosenza, V.A.; Sáenz, D.A.; Navarro, D.A.; Stortz, C.A.; Céspedes, M.A.; Mamone, L.A.; Casas, A.G.; Di Venosa, G.M. Disaccharides Obtained from Carrageenans as Potential Antitumor Agents. *Sci Rep*, **2019**, *9*, 6654, doi:10.1038/s41598-019-43238-y.
112. Cicinskas, E.; Begun, M.A.; Tlasto, V.A.; Belousov, A.S.; Vikhareva, V.V.; Mikhailova, V.A.; Kalitnik, A.A. In Vitro Antitumor and Immunotropic Activity of Carrageenans from Red Algae *Chondrus Armatus* and Their Low-Molecular Weight Degradation Products. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2020**, *108*, 254–266, doi:10.1002/jbm.a.36812.
113. Tlasto, V.A.; Goncharov, N.V.; Romanishin, A.O.; Zhidkov, M.E.; Khotimchenko, Y.S.  $\kappa$ - and  $\lambda$ -Carrageenans from Marine Alga *Chondrus Armatus* Exhibit Anticancer In Vitro Activity in Human Gastrointestinal Cancers Models. *Marine Drugs*, **2022**, *20*, 741, doi:10.3390/md20120741.
-

- 
114. Velu, R.; Shakila, R.; Jawahar, P.; Srinivasan, A. Influence of Species, Geographic Location, Seasonal Variation and Extraction Method on the Fucoidan Yield of the Brown Seaweeds of Gulf of Mannar, India, **2017**, *79*, 65–71.
115. Jayawardena, T.U.; Nagahawatta, D.P.; Fernando, I.P.S.; Kim, Y.-T.; Kim, J.-S.; Kim, W.-S.; Lee, J.S.; Jeon, Y.-J. A Review on Fucoidan Structure, Extraction Techniques, and Its Role as an Immunomodulatory Agent. *Mar Drugs*, **2022**, *20*, 755, doi:10.3390/md20120755.
116. Du, B.; Zhao, Q.; Cheng, C.; Wang, H.; Liu, Y.; Zhu, F.; Yang, Y. A Critical Review on Extraction, Characteristics, Physicochemical Activities, Potential Health Benefits, and Industrial Applications of Fucoidan. *eFood*, **2022**, *3*, e19, doi:10.1002/efd2.19.
117. Lin, J.; Jiao, G.; Kermanshahi-pour, A. Algal Polysaccharides-Based Hydrogels: Extraction, Synthesis, Characterization, and Applications. *Marine Drugs*, **2022**, *20*, 306, doi:10.3390/md20050306.
118. Lomartire, S.; Gonçalves, A.M.M. Novel Technologies for Seaweed Polysaccharides Extraction and Their Use in Food with Therapeutically Applications—A Review. *Foods*, **2022**, *11*, 2654, doi:10.3390/foods11172654.
119. Hahn, T.; Lang, S.; Ulber, R.; Muffler, K. Novel Procedures for the Extraction of Fucoidan from Brown Algae. *Process Biochemistry*, **2012**, *47*, 1691–1698, doi:10.1016/j.procbio.2012.06.016.
120. Lim, S.J.; Wan Aida, W.M. Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) From Brown Seaweed. In *Seaweed Polysaccharides*; Elsevier, **2017**; pp. 27–46 ISBN 978-0-12-809816-5.
121. January, G.; Naidoo, R.; Kirby-McCullough, B.; Bauer, R. Assessing Methodologies for Fucoidan Extraction from South African Brown Algae. *Algal Research*, **2019**, *40*, doi:10.1016/j.algal.2019.101517.
122. Mensah, E.O.; Kanwugu, O.N.; Panda, P.K.; Adadi, P. Marine Fucoidans: Structural, Extraction, Biological Activities and Their Applications in the Food Industry. *Food Hydrocolloids*, **2023**, *142*, 108784, doi:10.1016/j.foodhyd.2023.108784.
123. Flórez-Fernández, N.; Torres, M.D.; González Muñoz, M.J.; Domínguez, H. Potential of Intensification Techniques for the Extraction and Depolymerization of Fucoidan. *Algal Research*, **2018**, *30*, 128–148, doi:10.1016/j.algal.2018.01.002.
124. Gupta, S.; Abu-Ghannam, N. Bioactive Potential and Possible Health Effects of Edible Brown Seaweeds (Review). *Trends in Food Science & Technology - TRENDS FOOD SCI TECHNOL*, **2011**, *22*, 315–326, doi:10.1016/j.tifs.2011.03.011.
-

- 
125. Menshova, R.V.; Anastyuk, S.D.; Ermakova, S.P.; Shevchenko, N.M.; Isakov, V.I.; Zvyagintseva, T.N. Structure and Anticancer Activity *in Vitro* of Sulfated Galactofucan from Brown Alga *Alaria Angusta*. *Carbohydrate Polymers*, **2015**, *132*, 118–125, doi:10.1016/j.carbpol.2015.06.020.
126. Nguyen, T.T.; Mikkelsen, M.D.; Tran, V.H.N.; Trang, V.T.D.; Rhein-Knudsen, N.; Holck, J.; Rasin, A.B.; Cao, H.T.T.; Van, T.T.T.; Meyer, A.S. Enzyme-Assisted Fucoidan Extraction from Brown Macroalgae *Fucus Distichus* Subsp. *Evanescens* and *Saccharina Latissima*. *Mar Drugs*, **2020**, *18*, 296, doi:10.3390/md18060296.
127. Anastyuk, S.D.; Shevchenko, N.M.; Ermakova, S.P.; Vishchuk, O.S.; Nazarenko, E.L.; Dmitrenok, P.S.; Zvyagintseva, T.N. Anticancer Activity *in Vitro* of a Fucoidan from the Brown Alga *Fucus Evanescens* and Its Low-Molecular Fragments, Structurally Characterized by Tandem Mass-Spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, **2012**, *87*, 186–194, doi:10.1016/j.carbpol.2011.07.036.
128. Xu, S.-Y.; Huang, X.; Cheong, K.-L. Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities. *Mar Drugs*, **2017**, *15*, doi:10.3390/md15120388.
129. Hahn, T.; Zayed, A.; Kovacheva, M.; Stadtmüller, R.; Lang, S.; Muffler, K.; Ulber, R. Dye Affinity Chromatography for Fast and Simple Purification of Fucoidan from Marine Brown Algae. *Engineering in Life Sciences*, **2015**, *16*, doi:10.1002/elsc.201500044.
130. Anastyuk, S.D.; Shevchenko, N.M.; Usoltseva (Menshova), R.V.; Silchenko, A.S.; Zadorozhny, P.A.; Dmitrenok, P.S.; Ermakova, S.P. Structural Features and Anticancer Activity *in Vitro* of Fucoidan Derivatives from Brown Alga *Saccharina Cichorioides*. *Carbohydrate Polymers*, **2017**, *157*, 1503–1510, doi:10.1016/j.carbpol.2016.11.031.
131. Anastyuk, S.D.; Imbs, T.I.; Shevchenko, N.M.; Dmitrenok, P.S.; Zvyagintseva, T.N. ESIMS Analysis of Fucoidan Preparations from *Costaria Costata*, Extracted from Alga at Different Life-Stages. *Carbohydr Polym*, **2012**, *90*, 993–1002, doi:10.1016/j.carbpol.2012.06.033.
132. Silchenko, A.S.; Rasin, A.B.; Kusaykin, M.I.; Kalinovsky, A.I.; Miansong, Z.; Changheng, L.; Malyarenko, O.; Zueva, A.O.; Zvyagintseva, T.N.; Ermakova, S.P. Structure, Enzymatic Transformation, Anticancer Activity of Fucoidan and Sulphated Fucooligosaccharides from *Sargassum Horneri*. *Carbohydrate Polymers*, **2017**, *175*, 654–660, doi:10.1016/j.carbpol.2017.08.043.
-

- 
133. Gomez, C.G.; Pérez Lambrecht, M.V.; Lozano, J.E.; Rinaudo, M.; Villar, M.A. Influence of the Extraction–Purification Conditions on Final Properties of Alginates Obtained from Brown Algae (*Macrocystis Pyrifera*). *International Journal of Biological Macromolecules*, **2009**, *44*, 365–371, doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.02.005.
134. Bruhn, A.; Janicek, T.; Manns, D.; Nielsen, M.M.; Balsby, T.J.S.; Meyer, A.S.; Rasmussen, M.B.; Hou, X.; Saake, B.; Göke, C.; et al. Crude Fucoïdan Content in Two North Atlantic Kelp Species, *Saccharina Latissima* and *Laminaria Digitata*—Seasonal Variation and Impact of Environmental Factors. *J Appl Phycol*, **2017**, *29*, 3121–3137, doi:10.1007/s10811-017-1204-5.
135. Oliveira, C.; Neves, N.M.; Reis, R.L.; Martins, A.; Silva, T.H. A Review on Fucoïdan Antitumor Strategies: From a Biological Active Agent to a Structural Component of Fucoïdan-Based Systems. *Carbohydrate Polymers*, **2020**, *239*, 116131, doi:10.1016/j.carbpol.2020.116131.
136. Zayed, A.; Muffler, K.; Hahn, T.; Rupp, S.; Finkelmeier, D.; Burger-Kentischer, A.; Ulber, R. Physicochemical and Biological Characterization of Fucoïdan from *Fucus Vesiculosus* Purified by Dye Affinity Chromatography. *Mar Drugs*, **2016**, *14*, 79, doi:10.3390/md14040079.
137. Chen, L.C.-M.; McLachlan, J. The Life History of *Chondrus Crispus* in Culture. *Can. J. Bot*, **1972**, *50*, 1055–1060, doi:10.1139/b72-129.
138. McCandless, E.L.; Craigie, J.S.; Walter, J.A. Carrageenans in the Gametophytic and Sporophytic Stages of *Chondrus Crispus*. *Planta*, **1973**, *112*, 201–212, doi:10.1007/BF00385324.
139. Stortz, C.A.; Bacon, B.E.; Cherniak, R.; Cerezo, A.S. High-Field NMR Spectroscopy of Cystocarpic and Tetrasporic Carrageenans from *Iridaea Undulosa*. *Carbohydrate Research*, **1994**, *261*, 317–326, doi:10.1016/0008-6215(94)84027-X.
140. Falshaw, R.; Furneaux, R.H. Carrageenan from the Tetrasporic Stage of *Gigartina Decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydr Res*, **1994**, *252*, 171–182, doi:10.1016/0008-6215(94)90014-0.
141. Guibet, M.; Kervarec, N.; Génicot, S.; Chevolot, Y.; Helbert, W. Complete Assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Spectra of *Gigartina Skottsbergii* Lambda-Carrageenan Using Carrabiose Oligosaccharides Prepared by Enzymatic Hydrolysis. *Carbohydr Res*, **2006**, *341*, 1859–1869, doi:10.1016/j.carres.2006.04.018.
-

- 
142. Bellion, C.; Hamer, G.K.; Yaphe, W. ANALYSIS OF KAPPA-IOTA HYBRID CARRAGEENANS WITH KAPPA-CARRAGEENASE, IOTA-CARRAGEENASE AND <sup>13</sup>C N.M.R. In *International Seaweed Symposium (Xth)*; Levrig, T., Ed.; De Gruyter: Berlin, Boston, **1981**, pp. 379–384 ISBN 978-3-11-086527-1.
143. van de Velde, F. Structure and Function of Hybrid Carrageenans. *Food Hydrocolloids*, **2008**, *22*, 727–734, doi:10.1016/j.foodhyd.2007.05.013.
144. Stancioff, D.J. REFLECTIONS ON THE INTERRELATIONSHIPS BETWEEN RED SEAWEED SOURCE CHEMISTRY AND USES. In *REFLECTIONS ON THE INTERRELATIONSHIPS BETWEEN RED SEAWEED SOURCE CHEMISTRY AND USES*; De Gruyter, **1981**, pp. 113–122 ISBN 978-3-11-086527-1.
145. Bixler, H.; Johndro, K.; Falshaw, R. Kappa-2 Carrageenan: Structure and Performance of Commercial Extracts II. Performance in Two Simulated Dairy Applications. *Food Hydrocolloids*, **2001**, *15*, 619–630, doi:10.1016/S0268-005X(01)00047-9.
146. van de Velde, F.; Antipova, A.S.; Rollema, H.S.; Burova, T.V.; Grinberg, N.V.; Pereira, L.; Gilseman, P.M.; Tromp, R.H.; Rudolph, B.; Grinberg, V.Y. The Structure of Kappa/Iota-Hybrid Carrageenans II. Coil-Helix Transition as a Function of Chain Composition. *Carbohydr Res*, **2005**, *340*, 1113–1129, doi:10.1016/j.carres.2005.02.015.
147. van de Velde, F.; Peppelman, H.A.; Rollema, H.S.; Tromp, R.H. On the Structure of Kappa/Iota-Hybrid Carrageenans. *Carbohydr Res*, **2001**, *331*, 271–283, doi:10.1016/s0008-6215(01)00054-4.
148. Knutsen, S.H.; Grasdalen, H. Characterization of Water-Extractable Polysaccharides from Norwegian *Furcellaria Lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR Spectroscopy, **1987**, *30*, 497–506, doi:10.1515/botm.1987.30.6.497.
149. Guibet, M.; Boulenguer, P.; Mazoyer, J.; Kervarec, N.; Antonopoulos, A.; Lafosse, M.; Helbert, W. Composition and Distribution of Carrabiose Moieties in Hybrid Kappa-/Iota-Carrageenans Using Carrageenases. *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 408–415, doi:10.1021/bm701109r.
150. Jouanneau, D.; Boulenguer, P.; Mazoyer, J.; Helbert, W. Enzymatic Degradation of Hybrid Iota-/Nu-Carrageenan by *Alteromonas Fortis* Iota-Carrageenase. *Carbohydr Res*, **2010**, *345*, 934–940, doi:10.1016/j.carres.2010.02.014.
151. Estevez, J.M.; Ciancia, M.; Cerezo, A.S. The System of Galactans of the Red Seaweed, *Kappaphycus Alvarezii*, with Emphasis on Its Minor Constituents. *Carbohydr Res*, **2004**, *339*, 2575–2592, doi:10.1016/j.carres.2004.08.010.
-

152. Zablackis, E.; Vreeland, V.; Doboszewski, B.; Laetsch, W.M. Differential Localization of Carrageenan Gelling Sequences in *Kappaphycus Alvarezii* Var. Tambalang (Rhodophyta) with FITC-Conjugated Carrageenan Oligosaccharides. *Journal of Phycology*, **1991**, *27*, 241–248, doi:10.1111/j.0022-3646.1991.00241.x.
153. Vreeland, V.; Zablackis, E.; Laetsch, W.M. MONOCLONAL ANTIBODIES AS MOLECULAR MARKERS FOR THE INTRACELLULAR AND CELL WALL DISTRIBUTION OF CARRAGEENAN EPITOPES IN *KAPPAPHYCUS* (RHODOPHYTA) DURING TISSUE DEVELOPMENT. *Journal of Phycology*, **1992**, *28*, 328–342, doi:10.1111/j.0022-3646.1992.00328.x.
154. Pereira, L.; Critchley, A.T.; Amado, A.M.; Ribeiro-Claro, P.J.A. A Comparative Analysis of Phycocolloids Produced by Underutilized versus Industrially Utilized Carrageenophytes (Gigartinales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* **2009**, *21*, 599–605, doi:10.1007/s10811-009-9447-4.
155. Skriptsova, A.V.; Shevchenko, N.M.; Tarbeeva, D.V.; Zvyagintseva, T.N. Comparative Study of Polysaccharides from Reproductive and Sterile Tissues of Five Brown Seaweeds. *Mar Biotechnol (NY)*, **2012**, *14*, 304–311, doi:10.1007/s10126-011-9413-4.
156. Mak, W.; Hamid, N.; Liu, T.; Lu, J.; White, W.L. Fucoïdan from New Zealand *Undaria Pinnatifida*: Monthly Variations and Determination of Antioxidant Activities. *Carbohydrate Polymers*, **2013**, *95*, 606–614, doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.047.
157. Fletcher, H.R.; Biller, P.; Ross, A.B.; Adams, J.M.M. The Seasonal Variation of Fucoïdan within Three Species of Brown Macroalgae. *Algal Research*, **2017**, *22*, 79–86, doi:10.1016/j.algal.2016.10.015.
158. Fernando, I.P.S.; Dias, M.K.H.M.; Madusanka, D.M.D.; Han, E.J.; Kim, M.J.; Jeon, Y.-J.; Ahn, G. Step Gradient Alcohol Precipitation for the Purification of Low Molecular Weight Fucoïdan from *Sargassum Siliquastrum* and Its UVB Protective Effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2020**, *163*, 26–35, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.232.
159. Iqbal, Z.; Sadaf, S. Commercial Low Molecular Weight Heparins - Patent Ecosystem and Technology Paradigm for Quality Characterization. *J Pharm Innov*, **2022**, 1–33, doi:10.1007/s12247-022-09665-7.
160. Bemiller, J.N. Acid-Catalyzed Hydrolysis of Glycosides\*. In *Advances in Carbohydrate Chemistry*; Wolfrom, M.L., Tipson, R.S., Eds.; Academic Press, **1967**; Vol. 22, pp. 25–108.
161. Joksimović, G.; Markovic, Z. Investigation of the Mechanism of Acidic Hydrolysis of Cellulose. *Acta Agriculturae Serbica*, **2007**.

- 
162. Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, H.S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar Drugs*, **2011**, *9*, 196–223, doi:10.3390/md9020196.
163. Tang, M.; Zhai, L.; Chen, J.; Wang, F.; Chen, H.; Wu, W. The Antitumor Potential of  $\lambda$ -Carrageenan Oligosaccharides on Gastric Carcinoma by Immunomodulation. *Nutrients*, **2023**, *15*, 2044, doi:10.3390/nu15092044.
164. Haroun-Bouhedja, F.; Ellouali, M.; Siquin, C.; Boisson-Vidal, C. Relationship between Sulfate Groups and Biological Activities of Fucans. *Thrombosis Research*, **2000**, *100*, 453–459, doi:10.1016/S0049-3848(00)00338-8.
165. Hwang, P.-A.; Yan, M.-D.; Kuo, K.-L.; Phan, N.N.; Lin, Y.-C. A Mechanism of Low Molecular Weight Fucoindans Degraded by Enzymatic and Acidic Hydrolysis for the Prevention of UVB Damage. *J Appl Phycol*, **2017**, *29*, 521–529, doi:10.1007/s10811-016-0929-x.
166. Zeng, M.; Pan, X. Insights into Solid Acid Catalysts for Efficient Cellulose Hydrolysis to Glucose: Progress, Challenges, and Future Opportunities. *Catalysis Reviews*, **2020**, *64*, 1–46, doi:10.1080/01614940.2020.1819936.
167. Sakamoto, Y.; Imamura, K.; Onda, A. Hydrolysis of Oligosaccharides and Polysaccharides on Sulfonated Solid Acid Catalysts: Relations between Adsorption Properties and Catalytic Activities. *ACS Omega* **2020**, *5*, 24964–24972, doi:10.1021/acsomega.0c03932.
168. Chen, H.; Yan, X.; Lin, J.; Wang, F.; Xu, W. Depolymerized Products of Lambda-Carrageenan as a Potent Angiogenesis Inhibitor. *J Agric Food Chem*, **2007**, *55*, 6910–6917, doi:10.1021/jf070183+.
169. Chen, X.; Sun-Waterhouse, D.; Yao, W.; Li, X.; Zhao, M.; You, L. Free Radical-Mediated Degradation of Polysaccharides: Mechanism of Free Radical Formation and Degradation, Influence Factors and Product Properties. *Food Chemistry*, **2021**, *365*, 130524, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130524.
170. Kalitnik, A.A.; Byankina Barabanova, A.O.; Nagorskaya, V.P.; Reunov, A.V.; Glazunov, V.P.; Solov'eva, T.F.; Yermak, I.M. Low Molecular Weight Derivatives of Different Carrageenan Types and Their Antiviral Activity. *J Appl Phycol*, **2013**, *25*, 65–72, doi:10.1007/s10811-012-9839-8.
171. Sun, T.; Tao, H.; Xie, J.; Zhang, S.; Xu, X. Degradation and Antioxidant Activity of  $\kappa$ -Carrageenans. *Journal of Applied Polymer Science*, **2010**, *117*, 194–199, doi:10.1002/app.31955.
-

- 
172. Prasetyaningrum, A.; Purwati, D.; Dharmawan, Y.; Ratnawati, R.; Jos, B. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentration on Molecular Weight and Functional Properties of Sulfated Polysaccharides from Red Seaweed (*Kappaphycus Alvarezii*). *AIP Conference Proceedings*, **2020**, *2197*, 070002, doi:10.1063/1.5140935.
173. Sun, Y.; Chen, X.; Cheng, Z.; Liu, S.; Yu, H.; Wang, X.; Li, P. Degradation of Polysaccharides from *Grateloupia Filicina* and Their Antiviral Activity to Avian Leucosis Virus Subgroup J. *Marine Drugs*, **2017**, *15*, 345, doi:10.3390/md15110345.
174. Sun, Y.; Yang, B.; Wu, Y.; Liu, Y.; Gu, X.; Zhang, H.; Wang, C.; Cao, H.; Huang, L.; Wang, Z. Structural Characterization and Antioxidant Activities of  $\kappa$ -Carrageenan Oligosaccharides Degraded by Different Methods. *Food Chemistry*, **2015**, *178*, 311–318, doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.105.
175. Zúñiga, E.A.; Matsuhiro, B.; Mejías, E. Preparation of a Low-Molecular Weight Fraction by Free Radical Depolymerization of the Sulfated Galactan from *Schizymenia Bideri* (Gigartinales, Rhodophyta) and Its Anticoagulant Activity. *Carbohydrate Polymers*, **2006**, *66*, 208–215, doi:10.1016/j.carbpol.2006.03.007.
176. Hou, Y.; Wang, J.; Jin, W.; Zhang, H.; Zhang, Q. Degradation of *Laminaria Japonica* Fucoïdan by Hydrogen Peroxide and Antioxidant Activities of the Degradation Products of Different Molecular Weights. *Carbohydr Polym*, **2012**, *87*, 153–159, doi:10.1016/j.carbpol.2011.07.031.
177. Wu, T.-C.; Hong, Y.-H.; Tsai, Y.-H.; Hsieh, S.-L.; Huang, R.-H.; Kuo, C.-H.; Huang, C.-Y. Degradation of *Sargassum Crassifolium* Fucoïdan by Ascorbic Acid and Hydrogen Peroxide, and Compositional, Structural, and In Vitro Anti-Lung Cancer Analyses of the Degradation Products. *Mar Drugs*, **2020**, *18*, 334, doi:10.3390/md18060334.
178. Jo, B.W.; Choi, S.-K. Degradation of Fucoïdians from *Sargassum Fulvellum* and Their Biological Activities. *Carbohydrate Polymers*, **2014**, *111*, 822–829, doi:10.1016/j.carbpol.2014.05.049.
179. Saliba, J.; Manseur, C.; Groult, H.; Akil, H.; Tannoury, M.; Troutaud, D.; Maugard, T.; Feuillard, J.; Arnaudin, I.; Jayat-Vignoles, C. Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic vLMW Fucoïdan Formulas Decrease PD-L1 Surface Expression in EBV Latency III and DLBCL Tumoral B-Cells by Decreasing Actin Network. *Mar Drugs*, **2023**, *21*, 132, doi:10.3390/md21020132.
180. Matusiak, J.; Maciołek, U.; Kosińska-Pezda, M.; Sternik, D.; Orzeł, J.; Grządka, E. Textural and Thermal Properties of the Novel Fucoïdan/Nano-Oxides Hybrid Materials with
-

---

Cosmetic, Pharmaceutical and Environmental Potential. *Int J Mol Sci*, **2022**, *23*, 805, doi:10.3390/ijms23020805.

181. Akiya, N.; Savage, P.E. Roles of Water for Chemical Reactions in High-Temperature Water. *Chem. Rev*, **2002**, *102*, 2725–2750, doi:10.1021/cr000668w.

182. Eha, K.; Pehk, T.; Heinmaa, I.; Kaleda, A.; Laos, K. Impact of Short-Term Heat Treatment on the Structure and Functional Properties of Commercial Furcellaran Compared to Commercial Carrageenans. *Heliyon*, **2021**, *7*, e06640, doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06640.

183. Azuma, K.; Ishihara, T.; Nakamoto, H.; Amaha, T.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Minami, S.; Takashima, O.; Ifuku, S.; et al. Effects of Oral Administration of Fucoidan Extracted from *Cladosiphon Okamuraanus* on Tumor Growth and Survival Time in a Tumor-Bearing Mouse Model. *Marine Drugs*, **2012**, *10*, 2337–2348, doi:10.3390/md10102337.

184. Aida, T.M.; Yamagata, T.; Watanabe, M.; Smith, R.L. Depolymerization of Sodium Alginate under Hydrothermal Conditions. *Carbohydrate Polymers*, **2010**, *80*, 296–302, doi:10.1016/j.carbpol.2009.11.032.

185. Matsushima, K.; Minoshima, H.; Kawanami, H.; Ikushima, Y.; Nishizawa, M.; Kawamukai, A.; Hara, K. Decomposition Reaction of Alginic Acid Using Subcritical and Supercritical Water. *Ind. Eng. Chem. Res*, **2005**, *44*, 9626–9630, doi:10.1021/ie0502640.

186. Falciglia, P.P.; Roccaro, P.; Bonanno, L.; De Guidi, G.; Vagliasindi, F.G.A.; Romano, S. A Review on the Microwave Heating as a Sustainable Technique for Environmental Remediation/Detoxification Applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2018**, *95*, 147–170, doi:10.1016/j.rser.2018.07.031.

187. Queffelec, J.; Flórez-Fernández, N.; Domínguez, H.; Torres, M.D. Microwave Hydrothermal Processing of *Undaria Pinnatifida* for Bioactive Peptides. *Bioresource Technology*, **2021**, *342*, 125882, doi:10.1016/j.biortech.2021.125882.

188. Chen, S.; Liu, H.; Yang, X.; Li, L.; Qi, B.; Hu, X.; Ma, H.; Li, C.; Pan, C. Degradation of Sulphated Polysaccharides from *Grateloupia Livida* and Antioxidant Activity of the Degraded Components. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2020**, *156*, 660–668, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.108.

189. Tang, F.; Chen, F.; Li, F. Preparation and Potential in Vivo Anti-Influenza Virus Activity of Low Molecular-Weight  $\kappa$ -Carrageenans and Their Derivatives. *Journal of Applied Polymer Science*, **2013**, *127*, doi:10.1002/app.37502.

190. Krishna Perumal, P.; Huang, C.-Y.; Chen, C.-W.; Anisha, G.S.; Singhanian, R.R.; Dong, C.-D.; Patel, A.K. Advances in Oligosaccharides Production from Brown Seaweeds:

---

Extraction, Characterization, Antimetabolic Syndrome, and Other Potential Applications. *Bioengineered*, **2023**, *14*, 2252659, doi:10.1080/21655979.2023.2252659.

191. Ghanbarzadeh, M.; Golmoradzadeh, A.; Homaei, A. Carrageenans and Carrageenases: Versatile Polysaccharides and Promising Marine Enzymes. *Phytochem Rev*, **2018**, *17*, 535–571, doi:10.1007/s11101-018-9548-2.

192. Matard-Mann, M. Recherche et caractérisation de nouvelles enzymes de bactéries marines actives sur les polysaccharides algaux par une approche biochimique et structurale. phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, **2017**.

193. Chauhan, P.; Saxena, A. Bacterial Carrageenases: An Overview of Production and Biotechnological Applications. *3 Biotech*, **2016**, *6*, doi:10.1007/s13205-016-0461-3.

194. Guibet, M.; Colin, S.; Barbeyron, T.; Genicot, S.; Kloareg, B.; Michel, G.; Helbert, W. Degradation of  $\lambda$ -Carrageenan by *Pseudoalteromonas Carrageenovora*  $\lambda$ -Carrageenase: A New Family of Glycoside Hydrolases Unrelated to  $\kappa$ - and  $\iota$ -Carrageenases. *Biochem J*, **2007**, *404*, 105–114, doi:10.1042//BJ20061359.

195. Papamichael, E.; Stergiou, P.-Y.; Foukis, A.; Kokkinou, M.; Theodorou, L. Effective Kinetic Methods and Tools in Investigating the Mechanism of Action of Specific Hydrolases. In *Medicinal chemistry and drug design*; **2012**; pp. 235–274 ISBN 978-953-51-0513-8.

196. Li, J.; Hu, Q.; Seswita-Zilda, D. Purification and Characterization of a Thermostable  $\lambda$ -Carrageenase from a Hot Spring Bacterium, *Bacillus* Sp. *Biotechnol. Lett*, **2014**, *36*, 1669–1674, doi:10.1007/s10529-014-1520-7.

197. Barzkar, N.; Rungsardthong, V.; Tamadoni Jahromi, S.; Laraib, Q.; Das, R.; Babich, O.; Sukhikh, S. A Recent Update on Fucoiidonase: Source, Isolation Methods and Its Enzymatic Activity. *Frontiers in Marine Science*, **2023**, *10*.

198. Vuillemin, M.; Silchenko, A.S.; Cao, H.T.T.; Kokoulin, M.S.; Trang, V.T.D.; Holck, J.; Ermakova, S.P.; Meyer, A.S.; Mikkelsen, M.D. Functional Characterization of a New GH107 Endo- $\alpha$ -(1,4)-Fucoiidanase from the Marine Bacterium *Formosa Haliotis*. *Mar Drugs*, **2020**, *18*, 562, doi:10.3390/md18110562.

199. Trang, V.T.D.; Mikkelsen, M.D.; Vuillemin, M.; Meier, S.; Cao, H.T.T.; Muschiol, J.; Perna, V.; Nguyen, T.T.; Tran, V.H.N.; Holck, J.; et al. The Endo- $\alpha$ (1,4) Specific Fucoiidanase Fhf2 From *Formosa Haliotis* Releases Highly Sulfated Fucoiidan Oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science*, **2022**, *13*, doi:10.3389/fpls.2022.823668.

200. Silchenko, A.S.; Kusaykin, M.I.; Kurilenko, V.V.; Zakharenko, A.M.; Isakov, V.V.; Zaporozhets, T.S.; Gazha, A.K.; Zvyagintseva, T.N. Hydrolysis of Fucoiidan by Fucoiidanase

---

Isolated from the Marine Bacterium, Formosa Algae. *Mar Drugs*, **2013**, *11*, 2413–2430, doi:10.3390/md11072413.

201. Tran, V.H.N.; Nguyen, T.T.; Meier, S.; Holck, J.; Cao, H.T.T.; Van, T.T.T.; Meyer, A.S.; Mikkelsen, M.D. The Endo- $\alpha$ (1,3)-Fucoidanase Mef2 Releases Uniquely Branched Oligosaccharides from *Saccharina Latissima* Fucoidans. *Mar Drugs*, **2022**, *20*, 305, doi:10.3390/md20050305.

202. Vickers, C.; Liu, F.; Abe, K.; Salama-Alber, O.; Jenkins, M.; Springate, C.M.K.; Burke, J.E.; Withers, S.G.; Boraston, A.B. Endo-Fucoidan Hydrolases from Glycoside Hydrolase Family 107 (GH107) Display Structural and Mechanistic Similarities to  $\alpha$ -L-Fucosidases from GH29. *Journal of Biological Chemistry*, **2018**, *293*, 18296–18308, doi:10.1074/jbc.RA118.005134.

203. Gerbst, A.G.; Grachev, A.A.; Ustiuzhanina, N.E.; Khatuntseva, E.A.; Tsvetkov, D.E.; Usov, A.I.; Shashkov, A.S.; Preobrazhenskaia, M.E.; Ushakova, N.A.; Nifant'ev, N.E. [Synthesis, NMR and conformational studies of fucoidan fragments. VI. Fragments, content of alpha-(1--->2)-bound fucobioside unit]. *Bioorg Khim*, **2004**, *30*, 156–167, doi:10.1023/b:rubi.0000023099.48598.9a.

204. Kinnaert, C.; Clausen, M.H. Towards a Synthetic Strategy for the Ten Canonical Carrageenan Oligosaccharides – Synthesis of a Protected  $\gamma$ -Carrageenan Tetrasaccharide. *Eur J Org Chem*, **2019**, *2019*, 3236–3243, doi:10.1002/ejoc.201900592.

205. Kinnaert, C.; Dugaard, M.; Nami, F.; Clausen, M.H. Chemical Synthesis of Oligosaccharides Related to the Cell Walls of Plants and Algae. *Chem. Rev*, **2017**, *117*, 11337–11405, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00162.

206. Krishna Perumal, P.; Dong, C.-D.; Chauhan, A.S.; Anisha, G.S.; Kadri, M.S.; Chen, C.-W.; Singhania, R.R.; Patel, A.K. Advances in Oligosaccharides Production from Algal Sources and Potential Applications. *Biotechnology Advances*, **2023**, *67*, 108195, doi:10.1016/j.biotechadv.2023.108195.

207. Lu, G.; Carihfield, C.L.; Gattu, S.; Veltri, L.M.; Holland, L.A. Capillary Electrophoresis Separations of Glycans. *Chem Rev*, **2018**, *118*, 7867–7885, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00669.

208. Kravchenko, A.O.; Menchinskaya, E.S.; Isakov, V.V.; Glazunov, V.P.; Yermak, I.M. Carrageenans and Their Oligosaccharides from Red Seaweeds *Ahnfeltiopsis Flabelliformis* and *Mastocarpus Pacificus* (Phylloporaceae) and Their Antiproliferative Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**, *24*, 7657, doi:10.3390/ijms24087657.

- 
209. Zhao, X.; Guo, F.; Hu, J.; Zhang, L.; Xue, C.; Zhang, Z.; Li, B. Antithrombotic Activity of Oral Administered Low Molecular Weight Fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thrombosis Research*, **2016**, *144*, 46–52, doi:10.1016/j.thromres.2016.03.008.
210. Zhang, Y.; Lang, B.; Zeng, D.; Li, Z.; Yang, J.; Yan, R.; Xu, X.; Lin, J. Truncation of K-carrageenase for Higher K-carrageenan Oligosaccharides Yield with Improved Enzymatic Characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2019**, *130*, 958–968, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.02.109.
211. Yu, G.; Guan, H.; Ioanoviciu, A.S.; Sikkander, S.A.; Thanawiroon, C.; Tobacman, J.K.; Toida, T.; Linhardt, R.J. Structural Studies on  $\kappa$ -Carrageenan Derived Oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, **2002**, *337*, 433–440, doi:10.1016/S0008-6215(02)00009-5.
212. Fu, Q.; Liang, T.; Zhang, X.; Du, Y.; Guo, Z.; Liang, X. Carbohydrate Separation by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography on a “click” Maltose Column. *Carbohydr Res*, **2010**, *345*, 2690–2697, doi:10.1016/j.carres.2010.09.033.
213. Zhou, G.; Xin, H.; Sheng, W.; Sun, Y.; Li, Z.; Xu, Z. In Vivo Growth-Inhibition of S180 Tumor by Mixture of 5-Fu and Low Molecular  $\lambda$ -Carrageenan from *Chondrus Ocellatus*. *Pharmacological Research*, **2005**, *51*, 153–157, doi:10.1016/j.phrs.2004.07.003.
214. Zhou, G.; Sheng, W.; Yao, W.; Wang, C. Effect of Low Molecular Lambda-Carrageenan from *Chondrus Ocellatus* on Antitumor H-22 Activity of 5-Fu. *Pharmacol. Res*, **2006**, *53*, 129–134, doi:10.1016/j.phrs.2005.09.009.
215. Mercogliano, M.F.; Bruni, S.; Elizalde, P.V.; Schillaci, R. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer. *Front Oncol*, **2020**, *10*, 584, doi:10.3389/fonc.2020.00584.
216. Chen, H.-M.; Yan, X.-J.; Mai, T.-Y.; Wang, F.; Xu, W.-F. Lambda-Carrageenan Oligosaccharides Elicit Reactive Oxygen Species Production Resulting in Mitochondrial-Dependent Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Int J Mol Med*, **2009**, *24*, 801–806, doi:10.3892/ijmm\_00000295.
217. Mi, T.-Y.; Yan, X.-J.; Chen, H.-M.; Lin, J.; Wang, F.; Xu, W.-F. [Proliferation inhibition of lambda-carrageenan oligosaccharides on HUVEC and expression of apoptotic relevant genes]. *Yao Xue Xue Bao*, **2008**, *43*, 474–479.
218. Wang, Y.; Xing, M.; Cao, Q.; Ji, A.; Liang, H.; Song, S. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar Drugs*, **2019**, *17*, doi:10.3390/md17030183.
-

219. Torres, M.D.; Flórez-Fernández, N.; Simón-Vázquez, R.; Giménez-Abián, J.F.; Díaz, J.F.; González-Fernández, Á.; Domínguez, H. Fucoidans: The Importance of Processing on Their Anti-Tumoral Properties. *Algal Research*, **2020**, *45*, 101748, doi:10.1016/j.algal.2019.101748.
220. Atashrazm, F.; Lowenthal, R.M.; Woods, G.M.; Holloway, A.F.; Dickinson, J.L. Fucoidan and Cancer: A Multifunctional Molecule with Anti-Tumor Potential. *Mar Drugs*, **2015**, *13*, 2327–2346, doi:10.3390/md13042327.
221. Zhang, Z.; Teruya, K.; Eto, H.; Shirahata, S. Induction of Apoptosis by Low-Molecular-Weight Fucoidan through Calcium- and Caspase-Dependent Mitochondrial Pathways in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, **2013**, *77*, 235–242, doi:10.1271/bbb.120631.
222. Chen, M.-C.; Hsu, W.-L.; Hwang, P.-A.; Chou, T.-C. Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. *Mar Drugs*, **2015**, *13*, 4436–4451, doi:10.3390/md13074436.
223. Tsai, H.-L.; Tai, C.-J.; Huang, C.-W.; Chang, F.-R.; Wang, J.-Y. Efficacy of Low-Molecular-Weight Fucoidan as a Supplemental Therapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Mar Drugs*, **2017**, *15*, 122, doi:10.3390/md15040122.
224. Chen, L.-M.; Yang, P.-P.; Al Haq, A.T.; Hwang, P.-A.; Lai, Y.-C.; Weng, Y.-S.; Chen, M.A.; Hsu, H.-L. Oligo-Fucoidan Supplementation Enhances the Effect of Olaparib on Preventing Metastasis and Recurrence of Triple-Negative Breast Cancer in Mice. *Journal of Biomedical Science*, **2022**, *29*, 70, doi:10.1186/s12929-022-00855-6.
225. Luo, B.; Wang, Z.; Chen, J.; Chen, X.; Li, J.; Li, Y.; Li, R.; Liu, X.; Song, B.; Cheong, K.-L.; et al. Physicochemical Characterization and Antitumor Activity of Fucoidan and Its Degraded Products from *Sargassum Hemiphyllum* (Turner) C. Agardh. *Molecules*, **2023**, *28*, 2610, doi:10.3390/molecules28062610.
226. Dempsey, L.A.; Brunn, G.J.; Platt, J.L. Heparanase, a Potential Regulator of Cell-Matrix Interactions. *Trends Biochem Sci*, **2000**, *25*, 349–351, doi:10.1016/s0968-0004(00)01619-4.
227. Vlodyavsky, I.; Goldshmidt, O.; Zcharia, E.; Atzmon, R.; Rangini-Guatta, Z.; Elkin, M.; Peretz, T.; Friedmann, Y. Mammalian Heparanase: Involvement in Cancer Metastasis, Angiogenesis and Normal Development. *Seminars in Cancer Biology*, **2002**, *12*, 121–129, doi:10.1006/scbi.2001.0420.

- 
228. Vlodayvsky, I.; Kayal, Y.; Hilwi, M.; Soboh, S.; Sanderson, R.D.; Ilan, N. Heparanase—A Single Protein with Multiple Enzymatic and Nonenzymatic Functions. *Proteoglycan Research*, **2023**, *1*, e6, doi:10.1002/pgr2.6.
229. Levy-Adam, F.; Feld, S.; Cohen-Kaplan, V.; Shteingauz, A.; Gross, M.; Arvatz, G.; Naroditsky, I.; Ilan, N.; Doweck, I.; Vlodayvsky, I. Heparanase 2 Interacts with Heparan Sulfate with High Affinity and Inhibits Heparanase Activity. *J Biol Chem*, **2010**, *285*, 28010–28019, doi:10.1074/jbc.M110.116384.
230. Gross-Cohen, M.; Feld, S.; Doweck, I.; Neufeld, G.; Hasson, P.; Arvatz, G.; Barash, U.; Naroditsky, I.; Ilan, N.; Vlodayvsky, I. Heparanase 2 Attenuates Head and Neck Tumor Vascularity and Growth. *Cancer Res*, **2016**, *76*, 2791–2801, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1975.
231. Peterson, S.B.; Liu, J. Multi-Faceted Substrate Specificity of Heparanase. *Matrix Biol*, **2013**, *32*, 223–227, doi:10.1016/j.matbio.2013.02.006.
232. Kreuger, J.; Spillmann, D.; Li, J.; Lindahl, U. Interactions between Heparan Sulfate and Proteins: The Concept of Specificity. *J Cell Biol*, **2006**, *174*, 323–327, doi:10.1083/jcb.200604035.
233. Peterson, S.B.; Liu, J. Unraveling the Specificity of Heparanase Utilizing Synthetic Substrates. *J Biol Chem*, **2010**, *285*, 14504–14513, doi:10.1074/jbc.M110.104166.
234. Heyman, B.; Yang, Y. Mechanisms of Heparanase Inhibitors in Cancer Therapy. *Exp Hematol*, **2016**, *44*, 1002–1012, doi:10.1016/j.exphem.2016.08.006.
235. Jiang, G.; Zheng, L.; Pu, J.; Mei, H.; Zhao, J.; Huang, K.; Zeng, F.; Tong, Q. Small RNAs Targeting Transcription Start Site Induce Heparanase Silencing through Interference with Transcription Initiation in Human Cancer Cells. *PLoS One*, **2012**, *7*, e31379, doi:10.1371/journal.pone.0031379.
236. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Invest*, **2009**, *119*, 1420–1428, doi:10.1172/JCI39104.
237. Naparstek, Y.; Cohen, I.R.; Fuks, Z.; Vlodayvsky, I. Activated T Lymphocytes Produce a Matrix-Degrading Heparan Sulphate Endoglycosidase. *Nature*, **1984**, *310*, 241–244, doi:10.1038/310241a0.
238. Young, E. The Anti-Inflammatory Effects of Heparin and Related Compounds. *Thromb Res*, **2008**, *122*, 743–752, doi:10.1016/j.thromres.2006.10.026.
-

- 
239. Vlodayky, I.; Iozzo, R.V.; Sanderson, R.D. Heparanase: Multiple Functions in Inflammation, Diabetes and Atherosclerosis. *Matrix Biol*, **2013**, *32*, 220–222, doi:10.1016/j.matbio.2013.03.001.
240. Goodall, K.J.; Poon, I.K.H.; Phipps, S.; Hulett, M.D. Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4. *PLoS One*, **2014**, *9*, e109596, doi:10.1371/journal.pone.0109596.
241. Zetser, A.; Bashenko, Y.; Edovitsky, E.; Levy-Adam, F.; Vlodayky, I.; Ilan, N. Heparanase Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression: Correlation with P38 Phosphorylation Levels and Src Activation. *Cancer Research*, **2006**, *66*, 1455–1463, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1811.
242. Hu, X.; Zhang, L.; Jin, J.; Zhu, W.; Xu, Y.; Wu, Y.; Wang, Y.; Chen, H.; Webster, K.A.; Chen, H.; et al. Heparanase Released from Mesenchymal Stem Cells Activates Integrin Beta1/HIF-2alpha/Flk-1 Signaling and Promotes Endothelial Cell Migration and Angiogenesis. *Stem Cells*, **2015**, *33*, 1850–1862, doi:10.1002/stem.1995.
243. Wei, R.; Sun, D.; Yang, H.; Yan, J.; Zhang, X.; Zheng, X.; Fu, X.; Geng, M.; Huang, X.; Ding, J. CTC Clusters Induced by Heparanase Enhance Breast Cancer Metastasis. *Acta Pharmacol Sin*, **2018**, *39*, 1326–1337, doi:10.1038/aps.2017.189.
244. Atallah, J.; Khachfe, H.H.; Berro, J.; Assi, H.I. The Use of Heparin and Heparin-like Molecules in Cancer Treatment: A Review. *Cancer Treatment and Research Communications*, **2020**, *24*, 100192, doi:10.1016/j.ctarc.2020.100192.
245. Galli, M.; Chatterjee, M.; Grasso, M.; Specchia, G.; Magen, H.; Einsele, H.; Celeghini, I.; Barbieri, P.; Paoletti, D.; Pace, S.; et al. Phase I Study of the Heparanase Inhibitor Roneparstat: An Innovative Approach for Uptile Myeloma Therapy. *Haematologica*, **2018**, *103*, e469–e472, doi:10.3324/haematol.2017.182865.
246. Rabelink, T.J.; van den Berg, B.M.; Garsen, M.; Wang, G.; Elkin, M.; van der Vlag, J. Heparanase: Roles in Cell Survival, Extracellular Matrix Remodelling and the Development of Kidney Disease. *Nat Rev Nephrol*, **2017**, *13*, 201–212, doi:10.1038/nrneph.2017.6.
247. Zhao, H.; Liu, H.; Chen, Y.; Xin, X.; Li, J.; Hou, Y.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Xie, C.; Geng, M.; et al. Oligomannurinate Sulfate, a Novel Heparanase Inhibitor Simultaneously Targeting Basic Fibroblast Growth Factor, Combats Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cancer Res*, **2006**, *66*, 8779–8787, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1382.
248. Alban, S.; Ludwig, R.J.; Bendas, G.; Schön, M.P.; Oostingh, G.J.; Radeke, H.H.; Fritzsche, J.; Pfeilschifter, J.; Kaufmann, R.; Boehncke, W.-H. PS3, a Semisynthetic Beta-1,3-
-

- Glucan Sulfate, Diminishes Contact Hypersensitivity Responses through Inhibition of L- and P-Selectin Functions. *J Invest Dermatol*, **2009**, *129*, 1192–1202, doi:10.1038/jid.2008.358.
249. Schoenfeld, A.-K.; Vierfuß, S.; Lühn, S.; Alban, S. Testing of Potential Glycan-Based Heparanase Inhibitors in a Fluorescence Activity Assay Using Either Bacterial Heparinase II or Human Heparanase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2014**, *95*, 130–138, doi:10.1016/j.jpba.2014.02.021.
250. Kosir, M.A.; Wang, W.; Zukowski, K.L.; Tromp, G.; Barber, J. Degradation of Basement Membrane by Prostate Tumor Heparanase. *J Surg Res*, **1999**, *81*, 42–47, doi:10.1006/jsre.1998.5519.
251. Kosir, M.A.; Quinn, C.C.; Zukowski, K.L.; Grignon, D.J.; Ledbetter, S. Human Prostate Carcinoma Cells Produce Extracellular Heparanase. *J Surg Res*, **1997**, *67*, 98–105, doi:10.1006/jsre.1996.4976.
252. Ardizzone, A.; Bova, V.; Casili, G.; Repici, A.; Lanza, M.; Giuffrida, R.; Colarossi, C.; Mare, M.; Cuzzocrea, S.; Esposito, E.; et al. Role of Basic Fibroblast Growth Factor in Cancer: Biological Activity, Targeted Therapies, and Prognostic Value. *Cells*, **2023**, *12*, 1002, doi:10.3390/cells12071002.
253. Poupard, N.; Groult, H.; Bodin, J.; Bridiau, N.; Bordenave-Juchereau, S.; Sannier, F.; Piot, J.-M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Maugard, T. Production of Heparin and  $\lambda$ -Carrageenan Anti-Heparanase Derivatives Using a Combination of Physicochemical Depolymerization and Glycol Splitting. *Carbohydr Polym*, **2017**, *166*, 156–165, doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.040.
254. Li, X.; Li, X.; Zhang, Q.; Zhao, T. Low Molecular Weight Fucoidan and Its Fractions Inhibit Renal Epithelial Mesenchymal Transition Induced by TGF-B1 or FGF-2. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2017**, *105*, 1482–1490, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.058.
255. Haddad, O.; Guyot, E.; Marinval, N.; Chevalier, F.; Maillard, L.; Gadi, L.; Laguillier-Morizot, C.; Oudar, O.; Sutton, A.; Charnaux, N.; et al. Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Marine drugs*, **2015**, *13*, 6588–6608, doi:10.3390/md13116588.
256. Buijsers, B.; Maciej-Hulme, M.; Jacobs, M.; Bebbber, M.B.; de Graaf, M.; Salmenov, R.; Parr, N.; Rabelink, T.J.; Nijenhuis, T.; van der Vlag, J. Glycosaminoglycans and Fucoidan Have a Protective Effect on Experimental Glomerulonephritis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **2023**, *10*.

- 
257. Burgess, R.R. A Brief Practical Review of Size Exclusion Chromatography: Rules of Thumb, Limitations, and Troubleshooting. *Protein Expression and Purification*, **2018**, *150*, 81–85, doi:10.1016/j.pep.2018.05.007.
258. Yang, D.; Zhang, W.; Zhang, H.; Zhang, F.; Chen, L.; Ma, L.; Larcher, L.; Chen, S.; Liu, N.; Zhao, Q.; et al. Progress, Opportunity, and Perspective on Exosome Isolation - Efforts for Efficient Exosome-Based Theranostics. *Theranostics*, **2020**, *10*, 3684–3707, doi:10.7150/thno.41580.
259. Hentati, F.; Tounsi, L.; Pierre, G.; Barkallah, M.; Ursu, A.V.; Ben Hlima, H.; Desbrières, J.; Le Cerf, D.; Fendri, I.; Michaud, P.; et al. Structural Characterization and Rheological and Antioxidant Properties of Novel Polysaccharide from Calcareous Red Seaweed. *Marine Drugs*, **2022**, *20*, 546, doi:10.3390/md20090546.
260. Ptak, S.H.; Sanchez, L.; Fretté, X.; Kurouski, D. Complementarity of Raman and Infrared Spectroscopy for Rapid Characterization of Fucoidan Extracts. *Plant Methods*, **2021**, *17*, 130, doi:10.1186/s13007-021-00830-6.
261. Li, H.; Li, H.; Qu, H.; Zhao, M.; Yuan, B.; Cao, M.; Cui, J. Suramin Inhibits Cell Proliferation in Ovarian and Cervical Cancer by Downregulating Heparanase Expression. *Cancer Cell International*, **2015**, *15*, 52, doi:10.1186/s12935-015-0196-y.
262. Cheng, B.; Gao, F.; Maissy, E.; Xu, P. Repurposing Suramin for the Treatment of Breast Cancer Lung Metastasis with Glycol Chitosan-Based Nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, **2019**, *84*, 378–390, doi:10.1016/j.actbio.2018.12.010.
263. Mayfosh, A.J.; Nguyen, T.K.; Hulett, M.D. The Heparanase Regulatory Network in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, **2021**, *22*, 11096, doi:10.3390/ijms222011096.
264. de Boer, C.; Armstrong, Z.; Lit, V.A.J.; Barash, U.; Ruijgrok, G.; Boyango, I.; Weitzenberg, M.M.; Schröder, S.P.; Sarris, A.J.C.; Meeuwenoord, N.J.; et al. Mechanism-Based Heparanase Inhibitors Reduce Cancer Metastasis in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2022**, *119*, e2203167119, doi:10.1073/pnas.2203167119.
265. Ampuja, M.; Jokimäki, R.; Juuti-Uusitalo, K.; Rodriguez-Martinez, A.; Alarmo, E.-L.; Kallioniemi, A. BMP4 Inhibits the Proliferation of Breast Cancer Cells and Induces an MMP-Dependent Migratory Phenotype in MDA-MB-231 Cells in 3D Environment. *BMC Cancer*, **2013**, *13*, 429, doi:10.1186/1471-2407-13-429.
266. Yurtal, Z.; Ozkan, H.; Kutlu, T.; Deveci, M.; Urfali, B.; Urfali, S. The Matrix Metalloproteinase Inhibitor Batimastat Reduces Epidural Fibrosis After Laminectomy in Rats. *Turk Neurosurg*, **2023**, *33*, 162–170, doi:10.5137/1019-5149.JTN.41841-22.2.
-

- 
267. Vandenbroucke, R.E.; Libert, C. Is There New Hope for Therapeutic Matrix Metalloproteinase Inhibition? *Nat Rev Drug Discov*, **2014**, *13*, 904–927, doi:10.1038/nrd4390.
268. Friand, V.; Haddad, O.; Papy-Garcia, D.; Hlawaty, H.; Vassy, R.; Hamma-Kourbali, Y.; Perret, G.-Y.; Courty, J.; Baleux, F.; Oudar, O.; et al. Glycosaminoglycan Mimetics Inhibit SDF-1/CXCL12-Mediated Migration and Invasion of Human Hepatoma Cells. *Glycobiology*, **2009**, *19*, 1511, doi:10.1093/glycob/cwp130.
269. Zcharia, E.; Metzger, S.; Chajek-Shaul, T.; Friedmann, Y.; Pappo, O.; Aviv, A.; Elkin, M.; Pecker, I.; Peretz, T.; Vlodaysky, I. Molecular Properties and Involvement of Heparanase in Cancer Progression and Mammary Gland Morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2001**, *6*, 311–322, doi:10.1023/a:1011375624902.
270. Fitton, J.H.; Stringer, D.N.; Karpinić, S.S. Therapies from Fucoidan: An Update. *Mar Drugs*, **2015**, *13*, 5920–5946, doi:10.3390/md13095920.
271. Pozharitskaya, O.N.; Obluchinskaya, E.D.; Shikov, A.N. Mechanisms of Bioactivities of Fucoidan from the Brown Seaweed *Fucus Vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Mar Drugs*, **2020**, *18*, 275, doi:10.3390/md18050275.
272. Flórez-Fernández, N.; Pontes, J.F.; Guerreiro, F.; Afonso, I.T.; Lollo, G.; Torres, M.D.; Domínguez, H.; da Costa, A.M.R.; Grenha, A. Fucoidan from *Fucus Vesiculosus*: Evaluation of the Impact of the Sulphate Content on Nanoparticle Production and Cell Toxicity. *Mar Drugs*, **2023**, *21*, 115, doi:10.3390/md21020115.
273. Ale, M.T.; Maruyama, H.; Tamauchi, H.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S. Fucoidan from *Sargassum* Sp. and *Fucus Vesiculosus* Reduces Cell Viability of Lung Carcinoma and Melanoma Cells in Vitro and Activates Natural Killer Cells in Mice in Vivo. *Int J Biol Macromol*, **2011**, *49*, 331–336, doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.05.009.
274. Sinurat, E.; Saepudin, E.; Peranginangin, R.; Hudiyono, S. Immunostimulatory Activity of Brown Seaweed-Derived Fucoidans at Different Molecular Weights and Purity Levels towards White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *J App Pharm Sci*, **2016**, *6*, 082–091, doi:10.7324/JAPS.2016.601011.
275. Vandanjon, L.; Burlot, A.-S.; Zamanileha, E.F.; Douzenel, P.; Ravelonandro, P.; Bourgougnon, N.; Bedoux, G. The Use of FTIR Spectroscopy as a Tool for the Seasonal Variation Analysis and for the Quality Control of Polysaccharides from Seaweeds. *Marine Drugs*, **2023**, *21*, 482, doi:10.3390/md21090482.
-

- 
276. Nagai, R.; Shirakawa, J.; Fujiwara, Y.; Ohno, R.; Moroishi, N.; Sakata, N.; Nagai, M. Detection of AGEs as Markers for Carbohydrate Metabolism and Protein Denaturation. *J Clin Biochem Nutr*, **2014**, *55*, 1–6, doi:10.3164/jcbrn.13-112.
277. Ryu, S.; Roh, H.; Noh, B.; Kim, S.; Oh, D.-K.; Lee, W.; Yoon, J.; Kim, S. Effects of Temperature and pH on the Non-Enzymatic Browning Reaction of Tagatose-Glycine Model System. *Food science and biotechnology*, **2003**, *12*, 675–679.
278. Almeida, J.R.M.; Bertilsson, M.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Gorsich, S.; Lidén, G. Metabolic Effects of Furaldehydes and Impacts on Biotechnological Processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2009**, *82*, 625–638, doi:10.1007/s00253-009-1875-1.
279. Kowalski, S.; Lukasiewicz, M.; Duda, A.; Ziec, G. 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) – Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **2013**, *63*, doi:10.2478/v10222-012-0082-4.
280. Shanmugam, M.; Mody, K.H. Heparinoid-Active Sulphated Polysaccharides from Marine Algae as Potential Blood Anticoagulant Agents. *Current Science*, **2000**, *79*, 1672–1683.
281. Mourão, P.A.S. Use of Sulfated Fucans as Anticoagulant and Antithrombotic Agents: Future Perspectives. *Curr Pharm Des*, **2004**, *10*, 967–981, doi:10.2174/1381612043452730.
282. Ustyuzhanina, N.E.; Ushakova, N.A.; Preobrazhenskaya, M.E.; Bilan, M.I.; Tsvetkova, E.A.; Krylov, V.B.; Anisimova, N.A.; Kiselevskiy, M.V.; Krukovskaya, N.V.; Li, C.; et al. Fucoidans as a Platform for New Anticoagulant Drugs Discovery. *Pure and Applied Chemistry*, **2014**, *86*, 1365–1375, doi:10.1515/pac-2014-0404.
283. Verma, S.S.; Rai, V.; Awasthee, N.; Dhasmana, A.; Rajalakshmi, D.S.; Nair, M.S.; Gupta, S.C. Isodeoxyelephantopin, a Sesquiterpene Lactone Induces ROS Generation, Suppresses NF- $\kappa$ B Activation, Modulates LncRNA Expression and Exhibit Activities Against Breast Cancer. *Sci Rep*, **2019**, *9*, 17980, doi:10.1038/s41598-019-52971-3.
284. Włoch, A.; Stygar, D.; Bahri, F.; Bażanów, B.; Kuropka, P.; Chelmecka, E.; Pruchnik, H.; Gładkowski, W. Antiproliferative, Antimicrobial and Antiviral Activity of  $\beta$ -Aryl- $\delta$ -Iodo- $\gamma$ -Lactones, Their Effect on Cellular Oxidative Stress Markers and Biological Membranes. *Biomolecules*, **2020**, *10*, 1594, doi:10.3390/biom10121594.
285. Kemboi, D.; Langat, M.K.; Siwe-Noundou, X.; Tshiwawa, T.; Krause, R.W.M.; Davison, C.; Smit, C.J.; de la Mare, J.-A.; Tembu, V.J. 13-Amino Derivatives of Dehydrocostus Lactone Display Greatly Enhanced Selective Toxicity against Breast Cancer Cells and Improved Binding Energies to Protein Kinases in Silico. *PLoS One*, **2022**, *17*, e0271389, doi:10.1371/journal.pone.0271389.
-

- 
286. Hamadou, W.S.; Bouali, N.; Alhejaili, E.B.; Soua, Z.; Patel, M.; Adnan, M.; Siddiqui, A.J.; Abdel-Gadir, A.-M.; Sulieman, A.M.E.; Snoussi, M.; et al. Acacia Honey-Derived Bioactive Compounds Exhibit Induction of P53-Dependent Apoptosis in the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *Pharmacognosy Magazine*, **2023**, *19*, 144–155, doi:10.1177/09731296221145076.
287. Ignatovich, L.; Muravenko, V.; Spura, J.; Popelis, J.; Domrachova, I.; Shestakova, I. Synthesis, Structure and Cytotoxicity of New 2-[(3-aminopropyl)Dimethylsilyl]-5-furfural Diethylacetals and 2-[(3-aminopropyl)Dimethylsilyl]-5-phenylfurans. *Applied Organometal Chemis*, **2013**, *27*, 406–411, doi:10.1002/aoc.2995.
288. Deux, J.-F.; Meddahi-Pellé, A.; Le Blanche, A.F.; Feldman, L.J.; Collic-Jouault, S.; Brée, F.; Boudghène, F.; Michel, J.-B.; Letourneur, D. Low Molecular Weight Fucoïdan Prevents Neointimal Hyperplasia in Rabbit Iliac Artery In-Stent Restenosis Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2002**, *22*, 1604–1609, doi:10.1161/01.atv.0000032034.91020.0a.
289. Li, W.; Xue, D.; Xue, M.; Zhao, J.; Liang, H.; Liu, Y.; Sun, T. Fucoïdan Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition via Regulation of the HIF-1 $\alpha$  Pathway in Mammary Cancer Cells under Hypoxia. *Oncol Lett*, **2019**, *18*, 330–338, doi:10.3892/ol.2019.10283.
290. Saliba, J. Points de Contrôle Inhibiteurs de La Réponse Immune Exprimés Par Les Lymphocytes B En Latence III de l'EBV et Fucoïdanes : Exemple de PD-L1. These de doctorat, Limoges, **2022**.
291. Auclair, H.; Ouk-Martin, C.; Roland, L.; Santa, P.; Al Mohamad, H.; Faumont, N.; Feuillard, J.; Jayat-Vignoles, C. EBV Latency III-Transformed B Cells Are Inducers of Conventional and Unconventional Regulatory T Cells in a PD-L1-Dependent Manner. *J Immunol*, **2019**, *203*, 1665–1674, doi:10.4049/jimmunol.1801420.
292. Teruya, K.; Kusumoto, Y.; Eto, H.; Nakamichi, N.; Shirahata, S. Selective Suppression of Cell Growth and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in HT1080 Fibrosarcoma Cells by Low Molecular Weight Fucoïdan Extract. *Mar Drugs*, **2019**, *17*, doi:10.3390/md17070421.
293. Xue, M.; Liang, H.; Tang, Q.; Xue, C.; He, X.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Liang, Z.; Bian, K.; Zhang, L.; et al. The Protective and Immunomodulatory Effects of Fucoïdan Against 7,12-Dimethyl Benz[a]Anthracene-Induced Experimental Mammary Carcinogenesis Through the PD1/PDL1 Signaling Pathway in Rats. *Nutr Cancer*, **2017**, *69*, 1234–1244, doi:10.1080/01635581.2017.1362446.
-

294. Yang, G.; Zhang, Q.; Kong, Y.; Xie, B.; Gao, M.; Tao, Y.; Xu, H.; Zhan, F.; Dai, B.; Shi, J.; et al. Antitumor Activity of Fucoidan against Diffuse Large B Cell Lymphoma in Vitro and in Vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **2015**, *47*, 925–931, doi:10.1093/abbs/gmv094.
295. Running, C.A.; Falshaw, R.; Janaswamy, S. Trivalent Iron Induced Gelation in Lambda-Carrageenan. *Carbohydr Polym*, **2012**, *87*, 2735–2739, doi:10.1016/j.carbpol.2011.11.018.
296. Arias, F.; Mansilla, A.; Matsuhira, B.; Pavez, J.; Torres, R.; Yáñez-S, M. Carrageenans from Nuclear Phases of Subantarctic *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) and Graft Copolymerization of Alkali-Modified Carrageenan with Acrylamide. *Journal of Applied Phycology*, **2015**, *28*, doi:10.1007/s10811-015-0641-2.
297. Miao, H.-Q.; Elkin, M.; Aingorn, E.; Ishai-Michaeli, R.; Stein, C.A.; Vlodaysky, I. Inhibition of Heparanase Activity and Tumor Metastasis by Laminarin Sulfate and Synthetic Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides. *International Journal of Cancer*, **1999**, *83*, 424–431, doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19991029)83:3<424::AID-IJC20>3.0.CO;2-L.
298. Ji, C.-F.; Ji, Y.-B.; Meng, D.-Y. Sulfated Modification and Anti-Tumor Activity of Laminarin. *Exp Ther Med*, **2013**, *6*, 1259–1264, doi:10.3892/etm.2013.1277.
299. Sanniyasi, E.; Gopal, R.K.; Damodharan, R.; Arumugam, A.; Sampath Kumar, M.; Senthilkumar, N.; Anbalagan, M. In Vitro Anticancer Potential of Laminarin and Fucoidan from Brown Seaweeds. *Sci Rep*, **2023**, *13*, 14452, doi:10.1038/s41598-023-41327-7.





---

**Résumé :** Les oligosaccharides (OS) sulfatés d'origine algale se sont clairement démarqués ces dernières années grâce à leurs fonctions anti-tumorales supportées par des effets pro-apoptotiques ou d'arrêt du cycle cellulaire. Plus récemment, leur capacité d'inhibition de l'héparanase (HPSE), une enzyme clé dans de nombreux mécanismes de la progression tumorale, a été démontrée, faisant de cette protéine une cible d'intérêt pour le criblage de nouveaux OS anti-tumoraux. Néanmoins, si plusieurs de ces OS ont été identifiés comme prometteurs dans la régulation de ces fonctions clés dans la pathologie cancéreuse, ils font encore à ce jour face à plusieurs défis limitant leur translation vers le stade clinique. Dans ces travaux, trois défis majeurs ont été traités incluant : la standardisation des formulations OS, le criblage et l'identification de nouveaux OS thérapeutiques, et la compréhension de leurs modes d'actions. La résolution de ces défis a été appliquée à des formulations d'oligosaccharides de  $\lambda$ -carraghénanes ( $\lambda$ -COs) et de fucoïdanes (F-Os), obtenues par une dépolymérisation radicalaire par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à partir de leurs polysaccharides (PS) natifs commerciaux. Pour le premier défi, les résultats ont démontré des différences de composition entre six  $\lambda$ -CARs natifs commerciaux. L'hétérogénéité structurale s'est transférée au sein des formulations d'OS même si elle était à la fois liée à la composition initiale du PS natif (présence d'autres CARs ou d'additifs) et à la méthode de dépolymérisation par l' $H_2O_2$  (présence d'espèce atypiques : lactones, polyols, etc). Dans un second temps, sur la base d'un crible phénotypique *in vitro*, nous avons démontré que, en plus des  $\lambda$ -COs, les  $\iota$ -COs représentaient des candidats anti-HPSE prometteurs contrairement aux  $\kappa$ -COs. Surtout, nous avons pu mettre en avant les F-Os comme de nouveaux inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'HPSE, rarement décrits jusqu'à lors. La comparaison de cette large « oligothèque » nous a permis de dégager une interaction « sucre-dépendant » et probablement « sulfate-dépendant ». Enfin, l'activité anti-migratoire des formulations de  $\lambda$ -COs et de F-Os a été évaluée sur deux lignées cancéreuses humaines de modèles de cancers solides du foie (Huh7) et du sein (MDA-MB-231). Les résultats obtenus sur cette activité dégagent des formulations d'OS thérapeutiques prometteuses mais montrent clairement qu'elle n'est pas fortement reliée à leur capacité d'inhiber l'activité enzymatique de l'HPSE. Par ailleurs, dans le cas des F-Os, nous avons montré qu'en plus d'inhiber la migration des cellules MDA-MB-231, les formulations sont aussi capables d'inhiber la prolifération de ces cellules malignes. Ce caractère « poly-pharmacologique » s'est de nouveau illustré dans un autre modèle, où deux formulations F-Os ont pu simultanément induire l'apoptose des cellules de lymphomes B et moduler l'expression membranaire de l'effecteur PD-L1.

**Mot clés :** oligosaccharides d'origine algale, thérapie anticancéreuse,  $\lambda$ -carraghénanes, fucoïdanes, dépolymérisation, héparanase, migration cellulaire, hépatocarcinome (Huh7), cancer du sein triple négatif, (MDA-MB-231).

**Abstract:** Sulfated algal oligosaccharides (OS) have clearly stood out in these recent years thanks to their anti-tumoral functions, supported by pro-apoptotic effects or cell cycle arrest. More recently, their capacity to inhibit heparanase (HPSE), a key enzyme involved in various mechanisms of tumor progression, has been demonstrated, making this protein a target of interest for screening new anti-tumoral OS. However, while several of these OS have been identified as promising in regulating these key functions in cancer pathology, they still face several challenges limiting their translation to the clinical stage. In this work, three major challenges have been addressed, including: standardization of the OS formulations, screening and identification of new therapeutic OS and understanding their mechanisms of action. The resolution of these challenges was applied to  $\lambda$ -carrageenan oligosaccharides ( $\lambda$ -COs) and fucoidans (F-Os) formulations obtained by radical depolymerization using hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) from their native commercial polysaccharides (PS). For the first challenge, the results demonstrated differences in the composition among six native commercial  $\lambda$ -CARs. Structural heterogeneity transferred within the OS formulations, was both related to the initial composition of the native PS (presence of other carrageenans or additives), but also to the  $H_2O_2$  depolymerization method (presence of atypical species: lactones, polyols, etc). Subsequently, based on *in vitro* screening, we demonstrated that, in addition to  $\lambda$ -COs,  $\iota$ -COs represented promising anti-HPSE candidates unlike  $\kappa$ -COs. Especially, we highlighted F-Os as new promising inhibitors of the enzymatic activity of HPSE, rarely described until now. The comparison of this broad «OS library» allowed us to identify a « sugar-dependent » and probably a « sulfate-dependent » interaction. Finally, the anti-migratory activity of  $\lambda$ -COs and F-Os formulations was evaluated on two human cancer cell lines solid models of liver (Huh7) and breast (MDA-MB-231) cancers. The results obtained from this activity suggest promising therapeutic OS formulations but clearly show that it is not strongly related to their capacity to inhibit the enzymatic activity of HPSE. Furthermore, in the case of F-Os, we demonstrated that in addition to inhibit the migration of MDA-MB-231 cells, the formulations are also capable of inhibiting proliferation of these malignant cells. This «poly-pharmacological» feature was further illustrated in another model, where two F-O formulations were able to simultaneously induce apoptosis of B lymphoma cells and modulate the membrane expression of the effector PD-L1.

**Key words:** algal-derived oligosaccharides, anti-cancer therapy,  $\lambda$ -carrageenans, fucoidans, depolymerization, heparanase, cellular migration, hepatocarcinoma (Huh7), triple negative breast cancer (MDA-MB-231).