

MÉLANIE DEPONT

**CRIBLAGE DE BACTÉRIES PRODUCTRICES
D'ENZYMES (FUCOSIDASE ET FUÇOÏDANE
HYDROLASE) CAPABLES DE DÉGRADER LES
FUÇOÏDANES**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en sciences et technologies des aliments
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES ALIMENTS ET DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

© Mélanie Depont, 2010

Résumé

Les fucanes, ou fucoïdanes, sont des polysaccharides caractéristiques des algues brunes comme *Saccharina longicuris*. Leur hydrolyse par des enzymes bactériennes amplifie leurs activités biologiques. Cependant, peu d'enzymes capables d'hydrolyser les fucoïdanes ont été découvertes et leurs actions sont spécifiques à la structure de chaque fucoïdane. Le but de ce projet est d'identifier des bactéries marines capables d'hydrolyser le fucoïdane. Des bactéries fucosidase positives ont d'abord été isolées par des préenrichissements à partir d'échantillons d'algues et d'eau de mer prélevés dans le fleuve St-Laurent (Ste-Luce, mai 2007) et sélectionnées par une réaction chromogénique. Le séquençage d'une section de la petite sous-unité du gène d'ADNr 16S a révélé que les bactéries sélectionnées appartenaient à *Pseudoalteromonas* spp. La cinétique de croissance d'une souche de *Pseudoalteromonas* dans un milieu à base d'eau de mer (Marine Broth) avec ou sans les différents sucres composant le fucoïdane (glucose, fucose ou galactose) n'a pas révélé de différence entre les milieux testés. Le dosage des activités enzymatiques de type fucosidase et fucoïdane hydrolase des extraits bruts de biomasse a été déterminé par la mesure de la libération du nitrophénol lors de l'hydrolyse du PNP- α -L-fucoside et par le dosage des sucres réducteurs, respectivement. L'activité spécifique de la fucosidase, optimisée à 20°C, est d'environ 0,014 U/mg et elle est constante dans le temps. Celle de la fucoïdane hydrolase, atteint sa valeur maximale de 0,67 U/mg après une heure d'incubation et est optimale à 50°C. Ce travail a permis l'isolement d'une bactérie productrice de deux enzymes capables de dégrader les fucoïdanes, soit la fucosidase et la fucoïdane hydrolase. Les gènes codant pour ces enzymes pourront ultérieurement être identifiés et servir au développement d'un procédé commercial de fractionnement du fucoïdane par bioconversion.

Remerciements

Je prends cet espace pour partager ma gratitude. Je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur Dr Denis Roy pour ses précieux conseils, pour avoir cru en moi et m'avoir offert la possibilité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire de génomique microbienne. Je remercie également ma codirectrice Dr Sylvie Turgeon pour son soutien et ses encouragements tout au long de mon cheminement scolaire.

Merci également au professionnel de recherche Pascal Dubé pour son aide technique et scientifique à certaines étapes cruciales de mon projet de recherche.

Merci à mes coéquipiers de travail de m'avoir épaulée et conseillée lors de mes expériences de laboratoire.

Merci également à mes parents de m'avoir toujours encouragée et crue en mes capacités tout au long de ma vie.

Je tiens aussi à remercier le partenaire industriel Innovactiv., anciennement Océanova, pour le soutien financier au projet.

Ce mémoire est présenté sous la forme d'un article scientifique.

Avant-propos

Cette thèse est présentée sous forme d'articles scientifiques. Les références bibliographiques des chapitres sont présentées à la fin du document.

Le mémoire est subdivisé en quatre chapitres. Le premier chapitre, intitulé « État des connaissances », donne une vue d'ensemble des connaissances actuelles sur la structure des fucoïdanes, leurs activités biologiques et les enzymes capables de les hydrolyser. Dans ce même chapitre, l'hypothèse, le but et les objectifs de recherche sont présentés.

Le chapitre 2, intitulé « Isolement de bactéries productrices d'enzymes capables d'hydrolyser le fucoïdane et fermentation du fucoïdane et de ses constituants », présente les techniques utilisés pour isoler les bactéries à partir de l'algue et de l'eau de mer et présentant une activité hydrolytique envers le fucoïdane. J'ai bénéficié de l'aide technique de Dr. Éric Rasolofo pour le protocole d'extraction de l'ADN microbien.

Le chapitre 3, intitulé « Cinétiques enzymatiques de la fucosidase et de la fucoïdane hydrolase », évalue l'activité enzymatique des deux enzymes présentes chez *Pseudoalteromonas* et l'effet des paramètres utilisés sur ces activités. J'ai bénéficié de l'aide du statisticien Claude Laberge pour l'analyse statistique de mes résultats.

Le chapitre 4 présente les conclusions générales de ce mémoire.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|--------|
| Résumé | p.ii |
| Remerciements..... | p.iii |
| Avant-propos..... | p.iv |
| Table des matières..... | p.v |
| Liste des tableaux | p.viii |
| Liste des figures | p.ix |
| Introduction générale..... | p.1 |
| Chapitre 1. État des connaissances..... | p.3 |
| 1.1 Fucoïdanes..... | p.4 |
| 1.2.1 Source | p.4 |
| 1.2.2 Poids moléculaire, structure et composition du fucoïdane | p.4 |
| 1.2 Enzymes | p.8 |
| 1.3 Activités biologiques des fucoïdanes..... | p.14 |
| 1.3.1 Activité anticoagulante et antithrombotique..... | p.14 |
| 1.3.2 Activité antioxydante..... | p.16 |
| 1.3.3 Activité antitumorale, immunomodulatoire et radio protectrice..... | p.19 |
| 1.3.4 Activité antiinflammatoire..... | p.23 |
| 1.3.5 Activité anticcomplément..... | p.26 |
| 1.3.6 Activité antivirale..... | p.28 |
| 1.3.7 Activité antiparasitaire..... | p.32 |
| 1.3.8 Effet sur les infections à prions..... | p.34 |
| 1.3.9 Effet sur les toxines | p.34 |
| 1.3.10 Protection gastrique..... | p.35 |
| 1.3.11 Activité contraceptive..... | p.36 |
| 1.3.12 Potentiel thérapeutique lors des chirurgies et des brûlures..... | p.38 |
| 1.3.13 Modification du métabolisme des lipides | p.41 |
| 1.3.14 Diminution des hépatopathies | p.42 |
| 1.3.15 Diminution des uropathies..... | p.43 |
| 1.3.16 Effet sur la maladie d'Alzheimer | p.44 |
| 1.3.17 Effet inhibiteur du vieillissement de la peau par les UV | p.45 |
| 1.3.18 Absorption au niveau humain | p.45 |
| 1.3.19 Stimulation du système immunitaire chez les plantes..... | p.45 |
| 1.3.20 Innocuité | p.46 |
| 1.4 Problématique et hypothèse | p.48 |
| 1.4.1 Problématique | p.48 |
| 1.4.2 Hypothèse..... | p.48 |
| 1.5 Objectifs..... | p.49 |
| 1.5.1 Objectif général | p.49 |
| 1.5.2 Objectifs spécifiques..... | p.49 |
| Chapitre 2. Isolement de bactéries productrices d'enzymes capable d'hydrolyser | p.50 |
| le fucoïdane et fermentation du fucoïdane et de ses constituants | |
| 2.1 Résumé | p.51 |
| 2.2 Introduction | p.52 |
| 2.3 Matériel et méthodes | p.52 |
| 2.3.1 Population à l'étude | p.52 |
| 2.3.2 Isolement de bactéries productrices d'enzymes hydrolysant le fucoïdane | p.53 |
| 2.3.3 Identification de la bactérie hydrolysant le fucoïdane | p.56 |
| 2.3.4 Standardisation de l'inoculum | p.57 |

| | |
|---|-------|
| 2.3.5 Fermentation | p.57 |
| 2.3.6 Comptes viables | p.58 |
| 2.3.7 Densité optique | p.58 |
| 2.3.8 Calcul du taux de croissance | p.58 |
| 2.4 Résultats | p.58 |
| 2.4.1 Identification de la souche fucosidase positive | p.58 |
| 2.4.2 Densité optique | p.60 |
| 2.4.3 Comptes viables | p.60 |
| 2.4.4 Taux de croissance | p.60 |
| 2.5 Discussion | p.64 |
| 2.6 Conclusion..... | p.66 |
| Chapitre 3. Cinétiques enzymatiques de la fucosidase et de la fucoïdane hydrolase | p.67 |
| 3.1 Résumé | p.68 |
| 3.2 Introduction | p.69 |
| 3.3 Matériel et méthodes | p.69 |
| 3.3.1 Obtention de l'extrait protéique | p.69 |
| 3.3.2 Quantification protéique | p.70 |
| 3.3.3 Activité fucosidase | p.70 |
| 3.3.3.1 Mesure de l'activité fucosidase..... | p.70 |
| 3.3.3.2 Détermination de la concentration de substrat, du temps, de la température et du pH sur l'activité fucosidase | p.71 |
| 3.3.4 Activité fucoïdane hydrolase | p.73 |
| 3.3.4.1 Courbe de calibration du fucose | p.73 |
| 3.3.4.2 Mesure de l'activité fucoïdane hydrolase | p.73 |
| 3.3.4.3 Détermination de la concentration de substrat, du temps, de la température et du pH sur l'activité fucoïdane hydrolase | p.75 |
| 3.4 Résultats | p.76 |
| 3.4.1 Activité fucosidase | p.76 |
| 3.4.1.1 Étude des conditions expérimentales sur l'activité fucosidase..... | p.81 |
| 3.4.2 Activité fucoïdane hydrolase | p.89 |
| 3.5 Discussion | p.95 |
| 3.5.1 Activité fucosidase | p.95 |
| 3.5.1.1 Effet de la température | p.95 |
| 3.5.1.1 Effet du pH | p.96 |
| 3.5.2 Activité fucoïdane hydrolase | p.96 |
| 3.5.2.1 Effet de la température | p.97 |
| 3.5.2.2 Effet du pH | p.98 |
| 3.6 Conclusion..... | p.99 |
| Chapitre 4. Conclusion | p.100 |
| Liste des références citées | p.103 |
| Annexe 1. Extraction de l'ADN..... | p.127 |
| Annexe 2. Amplification de l'ADNr 16S..... | p.128 |
| Annexe 3. Purification de la réaction PCR..... | p.129 |
| Annexe 4. Réalisation de la réaction de séquençage..... | p.130 |
| Annexe 5. Purification à l'éthanol | p.131 |
| Annexe 6. Activité fucoïdane hydrolase de l'extrait protéique | p.132 |
| Annexe 7 : Production d'enzymes par différentes espèces de <i>Pseudoalteromonas</i> | p.133 |
| Annexe 8 : Utilisation de différents composés par diverses espèces de | p.134 |

Annexe 9 : Suite Annexe 8p.135

Annexe 10 : Pigmentation et température de croissance de diverses espèces dep.136

Pseudoalteromonas

Liste des tableaux

| | |
|---|------|
| Tableau 1 : Poids moléculaire de fucoïdanes extraits de différentes algues | p.4 |
| Tableau 2 : Composition des fucoïdanes de diverses algues..... | p.6 |
| Tableau 3 : Espèces bactériennes capable de dégrader le fucoïdane | p.10 |
| Tableau 4 : Espèces d'invertébrés marins dégradant le fucoïdane | p.11 |
| Tableau 5 : Synthèse du sens de l'activité biologique selon le poids moléculaire | p.47 |
| Tableau 6 : Préenrichissements utilisés pour favoriser la croissance de bactéries | p.54 |
| capable d'hydrolyser le fucoïdane | |
| Tableau 7 : Taux de croissance de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. en présence des | p.61 |
| différents sucres à 0,5% | |
| Tableau 8 : CCD pour l'activité fucosidase | p.72 |
| Tableau 9 : CCD des variables et réponse de l'activité fucosidase | p.82 |
| Tableau 10 : Analyse statistique des facteurs linéaires, quadratique et de l'interaction | p.83 |
| entre les facteurs | |
| Tableau 11 : Analyse de la variance..... | p.84 |
| Tableau 12 : Estimation de la réponse maximale de la fucosidase..... | p.85 |
| Tableau 13 : Test sur le lack of fit..... | p.88 |

Liste des figures

| | |
|---|------|
| Figure 1 : Structure du fucoïdane | p.5 |
| Figure 2 : Domaine N-terminal catalytique des fucoïdane hydrolase | p.8 |
| d' <i>Alteromonas</i> sp. (Fda2) et de <i>Mariniflexile fucanivorans</i> sp. (FcnA) | |
| Figure 3 : Voie de la coagulation sanguine | p.16 |
| Figure 4 : Voies d'activation du complément..... | p.27 |
| Figure 5 : Cycle parasitaire de <i>Plasmodium falciparum</i> | p.33 |
| Figure 6 : Réaction chromogénique | p.55 |
| Figure 7 : Arbre phylogénétique de toutes les <i>Pseudoalteromonas</i> isolées à partir | p.59 |
| de l'eau de mer | |
| Figure 8 : Suivi de la densité optique de la croissance de <i>Pseudoalteromonas</i> spp. | p.62 |
| sur différents substrats | |
| Figure 9 : Suivi des comptes viables lors de la croissance de <i>Pseudoalteromonas</i> | p.63 |
| spp. sur différents substrats | |
| Figure 10 : Réaction d'hydrolyse du PNP α -L-fuc | p.71 |
| Figure 11: Réaction de Nelson et Somogyi | p.74 |
| Figure 12: Activité de la fucosidase en fonction du paranitrophenyl- α -L-fucopyranoside | p.77 |
| Figure 13: Activité de la fucosidase en fonction du temps..... | p.78 |
| Figure 14: Activité de la fucosidase en fonction de la température | p.79 |
| Figure 15: Activité de la fucosidase en fonction du pH | p.80 |
| Figure 16 : Activité fucosidase en fonction du temps et de la température..... | p.85 |
| Figure 17 : Activité fucosidase en fonction du temps et de la température sans la valeur | |
| aberrante | |
| | p.87 |
| Figure 18 : Activité de la fucoïdane hydrolase en fonction de la | p.91 |
| concentration de substrat | |
| Figure 19: Activité de la fucoïdane hydrolase en fonction du temps..... | p.92 |
| Figure 20: Activité de la fucoïdane hydrolase en fonction de la température | p.93 |
| Figure 21 : Activité de la fucoïdane hydrolase en fonction du pH | p.94 |

Introduction générale

L'industrie des algues marines représente un marché d'une valeur annuelle totale de 5,5 à 6 milliards de dollars (FAO, 2004). La plus grande partie de la production est destinée à la consommation humaine, mais d'autres débouchés très diversifiés comme dans les secteurs de la nutraceutique, de la cosmétique et de la pharmacologie sont des domaines avec un potentiel de développement considérable.

En agroalimentaire, les algues sont utilisées comme aliments, comme compléments ou sous forme d'additifs. Les algues alimentaires sont faibles en calories et ont une bonne valeur nutritionnelle grâce à leur concentration élevée en minéraux, en vitamines, en protéines et en glucides non digestibles (Rupérez et *al.*, 2002). Ces glucides non digestibles diffèrent des fibres provenant des plantes terrestres (Alexeeva et *al.*, 2002). Parmi les polysaccharides des algues, les fucoïdanes présentent de nombreuses activités biologiques analogues à celles de polysaccharides sulfatés d'origine animale comme l'héparine et la chondroïtine sulfate (Nagumo et Nishino, 1996 ; Chaubet et *al.*, 2000 ; Kuznetsova et *al.*, 2003). L'utilisation d'un anticoagulant de source végétale plutôt qu'animal permettrait de diminuer le risque de transmission d'agents infectieux tels que les virus ou les prions. Des propriétés contraceptives (Dravland et Mortimer, 1988 ; Patankar et *al.*, 1993), anti-inflammatoires (Angstwurm et *al.*, 1995 ; Preobrahenskaya et *al.*, 1997), antivirales (McClure et *al.*, 1992 ; Béress et *al.*, 1993), antioxydantes (Rupérez et *al.*, 2002), antimutagènes et antitumorales (Soeda et *al.*, 1994) de même que des propriétés modificatrices du métabolisme des lipides chez l'humain ont aussi été observées chez les fucoïdanes. Ces activités sont influencées par le poids moléculaire, la nature des unités de base, le type de liaison, la géométrie de la molécule, le contenu en sulfates de même que la position de ces groupements (Grauffel et *al.*, 1989 ; Peirera et *al.*, 2002).

Les algues sont cultivées dans plusieurs endroits du monde parce que la demande a augmenté rapidement. Au Canada les algues exclusives aux côtes de l'Atlantique Nord sont encore très peu exploitées, mais leur utilisation comme source d'agents bioactifs (fucoïdanes) nécessite une connaissance plus approfondie de leur disponibilité, de leur concentration, de leur composition et de leur activité biologique.

La caractérisation des algues nécessite l'hydrolyse de structures complexes telles que les ramifications puisqu'un haut poids moléculaire et une ramification importante nuisent à la détermination de la structure. L'hydrolyse des polysaccharides extraits des algues est souvent nécessaire pour augmenter leurs activités biologiques. À cet égard, les méthodes d'hydrolyse des sucres complexes peuvent se faire par irradiation aux rayons gamma ou de façon chimique, ou enzymatique. L'exposition aux rayons gamma permet le clivage des liens glycosidiques du fucoïdane alors que les rayons UV augmentent le nombre de groupements carboxyle et carbohydyle (Choi et *al.*, 2009). Lors d'une hydrolyse chimique, des modifications de certaines caractéristiques structurales importantes, comme le degré de sulfatation, peuvent se produire (Urvansteva et *al.*, 2006). Par conséquent, l'approche enzymatique est souhaitable. Cependant, à l'heure actuelle, aucune enzyme n'est disponible commercialement. De plus, l'activité enzymatique est souvent spécifique au fucoïdane étudié, parce que le type de liaison, le contenu en sulfate et leurs positions varient d'un fucoïdane à un autre. À ce jour, seules des enzymes provenant de microorganismes, tels que *Vibrio* spp. (Furukawa et *al.*, 1992), *Flavobacterium* spp. (Sakai et *al.*, 1997 ; Bakunina et *al.*, 2002 ; Descamps et *al.*, 2006) et *Pseudoalteromonas* spp. de même que de mollusques tels que *Pecten maximus* (Berteau et *al.*, 2002) et *Littorina kurila* (Bilan et *al.*, 2005) ont une activité enzymatique sur les fucoïdanes. De surcroît, la production d'enzymes par les organismes est limitée et la purification complète de la protéine entraîne souvent une perte importante de son activité (Bilan et *al.*, 2005). Le but de cette étude est donc d'isoler et de caractériser des bactéries possédant des activités enzymatiques capables d'hydrolyser les fucoïdanes.

Chapitre 1

État des connaissances

1.1. Fucoïdanes

1.1.1. Sources

Les fucoïdanes sont des polysaccharides présents dans la paroi cellulaire de certaines algues brunes, mais absents des algues vertes, rouges et dorées, des algues d'eau douce et des plantes terrestres (Rupérez *et al.*, 2002 ; Berreau et Mulloy, 2003). Les *Fucales* et les *Laminariales* sont les deux ordres d'algues brunes présentant la plus grande proportion de fucoïdanes. De surcroît, certains invertébrés marins tels que le concombre de mer (Mourao et Bastos, 1987 ; Ribeiro *et al.*, 1994) et l'oursin (Mulloy *et al.*, 1994 ; Alves *et al.*, 1997, 1998 ; Vilela-Silva *et al.*, 1999, 2002) sont pourvus de fucoïdanes. Cependant, les fucoïdanes extraits des algues présentent une activité biologique plus élevée que ceux extraits des invertébrés, ce qui est probablement dû à la plus grande complexité structurale des fucoïdanes des algues.

1.1.2. Poids moléculaire, structure et composition du fucoïdane

Les fucoïdanes ont des poids moléculaires variant entre 13 et 950 kDa (Tableau 1), peuvent être hydrolysés de façon chimique ou enzymatique puis séparés par chromatographie sur gel de filtration, sur C-PAGE ou sur colonne d'échange anionique (Holtkamp *et al.*, 2009). Les activités biologiques des fucoïdanes sont très fortement liées au poids moléculaire et au degré de sulfatation. À cet égard, un fucoïdane de haut poids moléculaire peut entraîner des problèmes de haute viscosité et de faible perméabilité au niveau des cellules, ce qui nuira à ses activités biologiques (Choi *et al.*, 2009).

Tableau 1- Poids moléculaire de fucoïdanes extraits de différentes algues

| <u>Algues</u> | <u>Poids moléculaire (KDa)</u> | <u>Référence</u> |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| <i>Fucus vesiculosus (Sigma)</i> | 100-180 | Suppiramaniam <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Fucus vesiculosus</i> | 160 | Ruperez <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Laminaria japonica</i> | 189 | Zhang <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Cladosiphon okamuranus</i> | 200 | Sakai <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | 417 à 1323 | Rioux <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Saccharina longicuris</i> | 454 à 576 | Rioux <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Fucus vesiculosus</i> | 529 à 877 | Rioux <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Hizifia fusiforme</i> | 950 | Li <i>et al.</i> , 2006 |

Les fucoïdanes sont des homo et hétéropolysaccharides constitués d'une chaîne de L-fucose sulfatés en position C-2 et/ou C-4 et liés par des liens (1-2, α 1-3 et/ou (1-4 (voir figure 1)

(Bilan et *al.*, 2004). Les fucoïdanes des algues sont constitués principalement de fucose et peuvent contenir certains résidus de glucose, galactose, mannose, xylose et d'acide glucuronique (Patakar et *al.*, 1993 ; Bilan et *al.*, 2002 ; Holtkamp et *al.*, 2009). Les fucoïdanes peuvent aussi contenir des groupements acétyles (Chandia et Matsuhira., 2008).

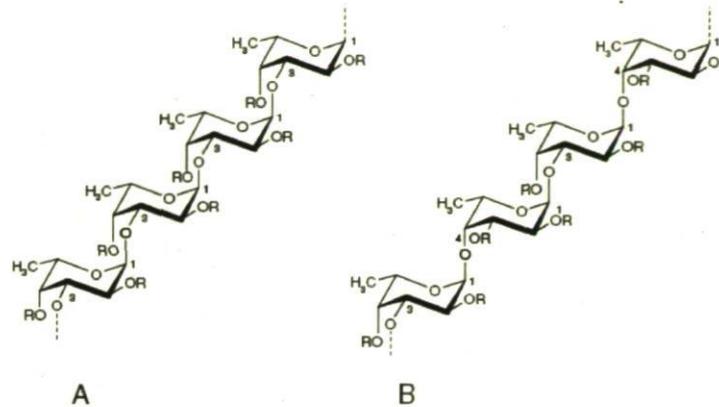


Figure 1- Structure de deux chaînes de fucoïdane constitué d'une chaîne d'homofucose. A- constitué d'une chaîne liée par des liens $\alpha(1-3)$ et B constitué d'une chaîne liée par des liens ((1-3) et (1-4). R indique la place d'attachement des groupements carbonés ou non carbonés (sulfates, groupements acétyles) (Holtkamp et *al.*, 2009)

La structure analysée à la suite d'une hydrolyse acide, radicalaire ou enzymatique par la méthode de résonance RMN, par spectrométrie de masse (MS)/chromatographie gazeuse, par ionisation par électrobulbation et/ou par HPLC (Holtkamp et *al.*, 2009). La structure complexe des fucoïdanes présents chez les algues complique leur analyse structurale et nécessite une combinaison de méthodes pour l'élucidation de la structure, du poids moléculaire et des sucres présents (Bilan et *al.*, 2004). Par exemple, la structure ramifiée et le haut poids moléculaire des fucoïdanes empêchent la détermination complète de la composition de ce polysaccharide par la méthode de résonance RMN. Cette méthode nécessite des poids moléculaires <20 000 Da, le fucoïdane doit donc être hydrolysé (Patankar et *al.*, 1993).

La composition en fucoïdanes varie selon l'espèce (voir tableau 2) (Bilan et *al.*, 2002 ; Dietrich et *al.*, 1995.), l'origine géographique de l'algue (Béress et *al.*, 1993 ; Zvyagintseva et *al.*, 1999), la saison, l'âge et le procédé d'extraction (Grauffel et *al.*, 1989), ce qui rend la caractérisation encore plus difficile. D'ailleurs, une méthode d'extraction trop sévère peut entraîner une destruction de la structure de sulfatation du fucoïdane, entraînant donc une perte

de la bioactivité de ce dernier (Holtkamp et al., 2009). De plus, les méthodes chimiques permettant l'élucidation de la structure du fucoïdane par hydrolyse, par désulfatation et par déacétylation nécessitent des conditions basiques ou acides à haute température qui peuvent modifier le polysaccharide. De fait, un groupe acétyle a été retrouvé chez tous les groupes d'algues hydrolysés de façon enzymatique au cours des dernières années, mais pas après hydrolyse chimique. Ce groupement acétyle pourrait être présent chez tous les fucoïdanes, mais être éliminé durant le procédé chimique (Bertheau et Mulloy, 2003). L'hydrolyse enzymatique permettrait une approche efficace et rapide pour caractériser les fucoïdanes présents dans les algues du St-Laurent, pour produire des fractions plus actives de ces polysaccharides sans en modifier la composition chimique nécessaire à plusieurs activités biologiques, et donc de valoriser les ressources locales du Québec.

Tableau 2- Composition des fucoïdanes de diverses algues

| <u>Algues brunes</u> | <u>Composition chimique</u> | <u>Référence</u> |
|---|--|---|
| <i>Adenocytis utricularis</i> | Fucose, galactose, mannose, sulfate | Ponce et al., 2003 |
| <i>Agarum cribrosum</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Alaria fistulosa</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Alaria marginata</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Analipus japonicus</i> | L-fucose/sulfate/groupement acétyle (3/2/1), xylose, galactose, acide uronique | Bilan et al., 2007 |
| <i>Arthrothamnus bifidus</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Ascophyllum nodosum</i> | Fucose (49 %), xylose (10 %), GlcA (11 %), sulfate | Percival et al., 1968 |
| <i>Bifurcaria bifurcate</i> | Fucose, xylose, GlcA, sulfate | Mian et al., 1973 |
| <i>Chorda filum</i> | Fucose, xylose, mannose, GlcA, galactose, sulfate | Bakunina et al., 2002; Chizhov et al., 1999 |
| <i>Chordaria flagelliformis</i> | L-fucose/sulfate/GlcA (1:1:0.25), groupement acétyle | Bilan et al., 2008 |
| <i>Chordaria gracilis</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Cladosiphon novae-caledoniae</i> kylin | Fucose (73 %), xylose (12 %), mannose (7 %), sulfate (14,5 %) | Ye et al., 2005 |
| <i>Cladosiphon okamuranus</i> | Fucose/xylose/GlcA/acide acétique/acide sulfurique (4/0.03/1/1/1) | Sakai et al., 2003; Cumashi et al., 2007; Teruya et al., 2007 |
| <i>Desmarestia intermedia</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Dictyosiphon foeniculaceus</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Dictyota menstrualis</i> | Fucose/xylose/acide uronique/galactose/sulfate (1/0.8/0.7/0.8/0.4) et (1/0.3/0.4/1.5/1.3) | Albuquerque et al., 2004 |
| <i>Ecklonia kurome</i> | Fucose, galactose, mannose, xylose, GlcA, sulfate | Nishino et al., 1989 |
| <i>Fucus evanescens</i> C.Ag. | Fucose/sulfate/acetate (1/1.23/0.36); Fucose (95 %), xylose (2,8 %), mannose (0,2 %), GlcA (2 %) | Bilan et al., 2002; Bakunina et al., 2002. Kuznetsova et al., 2003; Bilan et al., 2006; Kusaikin et al., 2003 |
| <i>Fucus distichus</i> | Fucose/sulfate/acetate (1/1.21/0.08), xylose (0,8 %), galactose (0,8 %) | Bilan et al., 2004; 2005 |
| <i>Fucus serratus</i> L. | Fucose/sulfate/acetate (1/1/0.1), xylose, galactose | Bilan et al., 2006 |
| <i>Fucus spiralis</i> | Fucose (33 %), xylose (2,8 %), mannose (1,4 %), glucose (1,2 %), galactose (3 %), acide uronique (8,2 %), sulfate (25,9 %) | Cumashi et al., 2007 |

| | | |
|-------------------------------------|--|--|
| <i>Fucus vesiculosus</i> | Fucose, sulfate (1/1.8) | Black et al., 1954; Nishino et al., 1994; Béress et al., 1993; Rocha de Souza et al., 2007 |
| <i>Himanthalia lorea</i> | Fucose, xylose, GlcA, sulfate | Mian et al., 1973 |
| <i>Hizikia fusiforme</i> | Fucose, galactose, mannose, xylose, GlcA, sulfate | Li et al., 2006 |
| <i>Kjellmaniella crassifolia</i> | Fucose (84 %), mannose (10 %), galactose (5 %), GlcA (6.8 %) | Sakai et al., 2002 |
| <i>Laminaria angustata</i> | Fucose/galactose/sulfate (9/1/9) | Kitamura et al., 1992 |
| <i>Laminaria bongardiana</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Laminaria dentigera</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Laminaria digitata</i> | Fucose (30,1 %), xylose (1.9 %), mannose (1,7 %), glucose (1,4 %), galactose (6,3 %), acide uronique (7 %), sulfate (27,5 %) | Cumashi et al., 2007 |
| <i>Laminaria japonica</i> | Fucose, galactose, mannose, glucose, arabinose, acide uronique, sulfate | Zhang et al., 2003 ; Wang et al., 2008 et 2009 |
| <i>Laminaria longipes</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Laminaria saccharina</i> | Fucose (36,7 %), xylose (1.2 %), mannose (1 %), Glucose (2.2 %), galactose (4,6 %), acide uronique (4,8 %), sulfate (29,6 %) | Cumashi et al., 2007 |
| <i>Lessonia vadosa</i> | Fucose/sulfate (1/1.12) | Chandia et al., 2008 |
| <i>Lobophora variegata</i> | fucose/galactose/sulfate (1/3/2) | Medeiros et al., 2008 |
| <i>Macrocytis integrifolia</i> | | Berteau et Mulloy, 2003 |
| <i>Macrocytis pyrifer</i> | Fucose/galactose (18/1), sulfate | Black et al., 1952 |
| <i>Padina pavonia</i> | Fucose, xylose, mannose, glucose, galactose, sulfate | Hussein et al., 1980 |
| <i>Pelvetia canaliculata</i> | Fucose, xylose, galactose | Descamps et al., 2006 |
| <i>Pelvetia wrightii</i> | Fucose/galactose (10/1), sulfate | Anno et al., 1966 |
| <i>Petalonia fascia</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Pylyayella littoralis</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Saccharina longicuris</i> | Sucres, acide uronique, sulfate | Rioux et al., 2007 |
| <i>Sargassum horneri</i> | fucose, sulfate, acide uronique | Preeprame et al., 2001 |
| <i>Sargassum Kjellmanium</i> | fucose, sulfate | Yamamoto et al., 1984 |
| <i>Sargassum stenophyllum</i> | Fucose, galactose, mannose, GlcA, glucose, xylose, sulfate | Duarte et al., 2001 |
| <i>Saundersella simplex</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Scytosiphon lomentaria</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Spatoglossum schroederi</i> | Fucose/xylose/galactose/sulfate (1/0.5/2/2) | Rocha et al., 2005 |
| <i>Stoechospermum marginatum</i> | Fucose, galactose, glucose, xylose, mannose, acide uronique et galacturonique, sulfate | Adhikari et al., 2006 |
| <i>Thalassiohyllum clathrus</i> | N.D. | Usov et al., 2001 |
| <i>Undaria pinnatifida</i> (Mekabu) | Fucose/galactose (1/1.1), mannose, acide glucuronique, sulfate | Lee et al., 2004; Maruyama et al., 2007 ; Li et al., 2008 |

1.2. Enzymes

Deux types de glycosidase hydrolysent les fucoïdanes, soit l' α -L-fucosidase (E.C.3.2.1.51) et la fucoïdane sulfate hydrolase (E.C.3.2.1.44) aussi appelée fucoïdanase (Berteau et Mulloy, 2003). L' α -L-fucosidase libère du L-fucose aux extrémités non réductrices du polysaccharide (Berteau et Mulloy, 2003). Pour sa part, la fucoïdane hydrolase peut se comporter de deux façons. D'une part, cette enzyme est en mesure d'agir comme une endo-fucoïdane hydrolase en coupant les liens glycosidiques à l'intérieur du polysaccharide. Cette hydrolyse amène une réduction rapide du poids moléculaire. D'autre part, cette enzyme peut se comporter comme une exo-fucoïdane hydrolase en coupant le polysaccharide aux extrémités, libérant quelques oligosaccharides et entraînant une faible diminution du poids moléculaire. Des gènes codant pour la fucoïdane hydrolase ont été isolés à partir de bactéries marines provenant d'*Alteromonas* sp. SM-1009 et de *Mariniflexile fucanivorans* sp. nov., puis clonés et exprimé dans *E.coli* (Colin et al., 2006 ; Barbeyron et al., 2008). Le domaine N-terminal catalytique de la fucoïdane hydrolase de ces deux bactéries a été comparé (voir figure 5). Le gène codant pour la fucoïdane hydrolase de *M. fucanivorans* comporte 3021 nucléotides et la protéine produite comporte 1007 acides aminés et clive le lien glycosidique $\alpha(1-4)$ du fucoïdane (Colin et al., 2006).

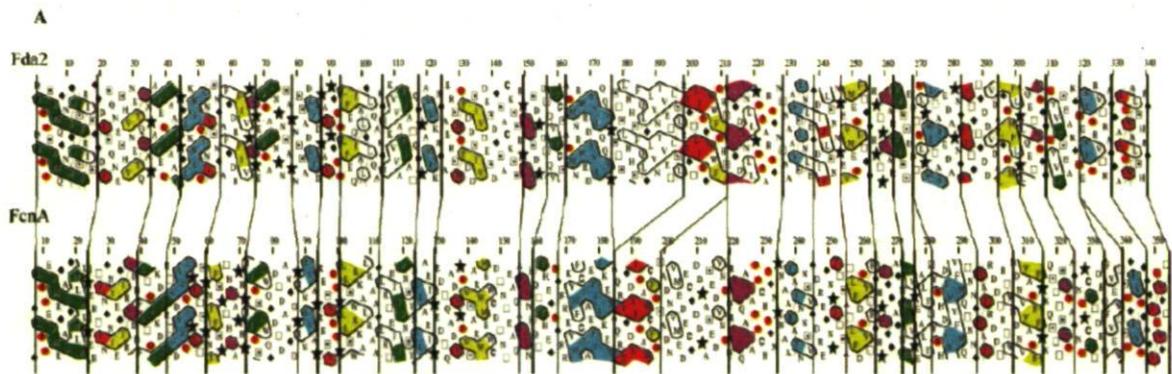


Figure 2- Domaine N-terminal catalytique des fucoïdane hydrolases d'*Alteromonas* sp. (Fda2) et de *M. fucanivorans* sp. (FcnA) (Colin et al., 2006)

Ces deux enzymes ont été découvertes chez des invertébrés marins et des bactéries marines, principalement les *proteo* et les *flavobacteria*, mais sont spécifiques à des éléments structuraux des fucoïdanes (voir tableaux 3 et 4) (Urvantseva et al., 2006). Par conséquent, le

patron et l'activité d'hydrolyse du fucoïdane par la fucoïdane hydrolase varient d'un fucoïdane à l'autre à cause des différences de sulfatation et de poids moléculaire (Kusaykin et al., 2003). Par exemple, l'activité de *Pseudoalteromonas citrea* isolée de *Fucus evanescens* est de 1,92 $\mu\text{mol}/\text{heure}$ lorsque le substrat utilisé est du fucoïdane de *F. evanescens* comparativement à 1,3 $\mu\text{mol}/\text{heure}$ lorsque le fucoïdane provient de *L. cichoriodes* (Bakunina et al., 2002). De plus, un haut degré de sulfatation des résidus de fucose rend la liaison glycosidique inaccessible pour l'enzyme (Kusaykin et al., 2006). La synthèse d'enzyme au sein d'une même espèce peut aussi varier selon l'habitat écologique et la source à partir de laquelle s'est fait l'isolement bactérien. Par exemple, l'activité de la fucoïdane hydrolase produite par la bactérie *P. citrea* varie de 0 à 1,9 $\mu\text{mol}/\text{heure}$ selon qu'elle soit isolée à partir d'herbe de mer, d'eau de mer, d'invertébrés marins ou d'algues (Bakunina et al., 2002 ; Ivanova et al., 2003).

Tableau 3- Espèces bactériennes capable de dégrader le fucoïdane

| Espèces | Fucosidase (nmol/min) | fucoïdane hydrolase (nmol/heure) | Origine du substrat de fucoïdane | Référence |
|--|-----------------------|----------------------------------|--|---|
| <i>Algibacter lectus</i> | 0 | 15,3 à 18,4 | <i>F. evanescens</i> , <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Bizionia sp.</i> | 0 | 16,3 | <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Formosa sp.</i> | 0 | 48,8 à 98,3 | <i>F. evanescens</i> , <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Fucobacter marina</i> | 0 | + | <i>K. crassifolia</i> , <i>U. pinnatifida</i> , <i>L. nigrescens</i> | Sakai et al., 2002, 2003 |
| <i>Fucophilus fucoidanolyticus</i> | 0 | + | <i>K. crassifolia</i> , <i>C. okamuranus</i> | Sakai et al., 2002, 2003 |
| <i>Gramella sp.</i> | | 5,5 à 56,8 | <i>F. evanescens</i> , <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Mariniflexile fucanivorans sp.</i> | + | + | <i>P. canaliculata</i> | Barbeyron et al., 2008 |
| <i>Marinobacter sedimenficola</i> | + | 7,9 à 16,1 | <i>F. evanescens</i> , <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Marinobacter sp.</i> | + | 14,7 à 52,4 | <i>F. evanescens</i> , <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Marinobacter ulvicola</i> | + | 9,4 | <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Mesonia algae</i> | 0 | 55 | <i>F. evanescens</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> | 0 | + | <i>F. vesiculosus</i> | Yaphé et Morgan, 1959 |
| <i>Pseudoalteromonas carrageenova</i> | 0 | + | <i>F. vesiculosus</i> | Yaphé et Morgan, 1959 |
| <i>Pseudoalteromonas citrea</i> | 3 à 50 | 300 à 1920 | <i>F. evanescens</i> , <i>L. cichorioides</i> | Bakunina et al., 2002; Ivanova et al., 2003 |
| <i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> | 0 | 30 à 400 | <i>F. evanescens</i> | Ivanova et al., 2002; 2003 |
| <i>Saccharophagus degradans</i> | 0 | + | | Ekborg et al., 2005 |
| <i>Salegentibacter sp.</i> | 0 | 8,6 à 23,0 | <i>F. evanescens</i> , <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> | 0 | + | <i>U. pinnatifida</i> | Kim et al., 2008 |
| <i>Vibrio sp.</i> | 0 | + | <i>K. crassifolia</i> | Furukawa et al., 1992 |
| <i>Winogradskyella eximia</i> | 0 | 11,9 | <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Zobellia sp.</i> | + | 8,7 à 20,5 | <i>F. evanescens</i> , <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Zobellia laminariae</i> | + | 1,8 | <i>L. cichorioides</i> | Urvantseva et al., 2006 |
| <i>Alteromonadaceae</i> | 0 | + | <i>K. crassifolia</i> | Sakai et al., 2004 |

Tableau 4- Espèces d'invertébrés marins dégradant le fucoïdane

| Espèce | Organes | Activité fucoïdane hydrolase (nmol/heure) | origine du substrat | Activité fucosidase (nmol/h) | Référence |
|-----------------------------------|------------------|---|--|------------------------------|-----------------------|
| ANNELIDA | | | | | |
| <u>Sabelidae</u> | tous | 80 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2003 |
| <u>Sabelidae</u> | tous | 187 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2004 |
| <i>Chaetopterus cautus</i> | tous | 235 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2006 |
| <i>Eudistylia polymorpha</i> | tous | 117 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2007 |
| <i>Sipunculida phascolosoma</i> | tous | 80 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2008 |
| <i>Tubulamus punctatus</i> | tous | 28 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2005 |
| NEMERTINI | | | | | |
| <u>Nemertini</u> | | | | | |
| <i>Collarenemertes bimaculata</i> | proboscis | 105 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2008 |
| CNIDARIA | | | | | |
| <u>Anthozoa</u> | | | | | |
| <i>Actinia sp.</i> | système digestif | 43 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2003 |
| <i>Anthopleura orientalis</i> | tous | 27 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2005 |
| <i>Cnidopulus japonicus</i> | tous | 19 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2004 |
| <i>Metridium sp.</i> | tous | 10 | <i>F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Tialia fellina</i> | tous | 38 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2006 |
| SIPUNCULA | | | | | |
| <u>Phascolosomatidae</u> | | | | | |
| <i>Phascolosoma agassizii</i> | tous | 60 | <i>F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| ARTHROPODA | | | | | |
| <u>Crustacea</u> | | | | | |
| <i>Balamus rostratus</i> | tous | 190 | <i>F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Cancer amphioetus</i> | hépatopancréas | 10 à 50 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | +++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Hemigrapsus sanguineus</i> | hépatopancréas | 10 à 70 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Pagurus beringanus</i> | tous | 32 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2003 |
| <i>Pagurus sp.</i> | tous | 10 | <i>L. cicchorioides</i> | - | Burtseva et al., 2000 |
| MOLLUSCA | | | | | |
| <u>Monoplacophora</u> | | | | | |
| <i>Astarte borealis</i> | hépatopancréas | 33 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2006 |
| <i>Lusivoluptosius sp.</i> | hépatopancréas | 18 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2007 |
| <i>Neptunea bulbacea</i> | hépatopancréas | 2 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2005 |

| | | | | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|-----------|--|------------|---|
| <i>Onchidiopsis</i> sp. | hépatopancréas | 86 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2003 |
| <i>Plicificus plicatus</i> | hépatopancréas | 7 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2004 |
| <u>Polyplacophora</u> | | | | | |
| <i>Lepidozona albrechti</i> | hépatopancréas | | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <u>Gastropoda</u> | | | | | |
| <i>Acmaea pallida</i> | tous | 30 | <i>F. evanescens</i> | +++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Haliotis corrugata</i> | | + | <i>Fucus gardneri</i> | | Thanassi et Nakada., 1967 |
| <i>Haliotis gigantea</i> | hépatopancréas | + | <i>Ecklonia cava</i> | + | Tanaka et Sorai., 1970 |
| <i>Haliotis rufescens</i> | | + | <i>Fucus gardneri</i> | | Thanassi et Nakada., 1967 |
| <i>Littorina brevicula</i> | hépatopancréas | | | +++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Littorina kurila</i> | hépatopancréas | 71 | <i>F. evanescens, F. distichus</i> | 4370 | Kuyaykin et al., 2003 |
| <i>Littorina sitkana</i> | hépatopancréas | 10 | <i>F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Littorina squalida</i> | hépatopancréas | 30 à 40 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | +++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Lottia</i> spp. | tous | 10 à 20 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | ++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Nusella heyseana</i> | hépatopancréas | 10 à 50 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <u>Bivalvia</u> | | | | | |
| <i>Crassostrea gigas</i> | hépatopancréas | 90 à 240 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Crenomytilus grayanus</i> | hépatopancréas | 200 à 240 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Cyclocardia rjabiniinae</i> | hépatopancréas | 41 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2003 |
| <i>Cyclocardia rjabiniinae</i> | tige cristalline | 14 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2003 |
| <i>Glycymeris yessoensis</i> | hépatopancréas | 60 | <i>F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Macra chinensis</i> | hépatopancréas | 50 | <i>F. evanescens</i> | ++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Macra chinensis</i> | tige cristalline | 10 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Mercenaria stimpsoni</i> | hépatopancréas | 20 à 110 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | ++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Mercenaria stimpsoni</i> | tige cristalline | 10 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Mizuhopecten yessoensis</i> | hépatopancréas | 10 à 50 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | ++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Mizuhopecten yessoensis</i> | tige cristalline | 10 à 20 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | n.d. | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Modiolus difficilis</i> | hépatopancréas | 38 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kuyaykin et al., 2003 |
| <i>Patinopecten yessoensis</i> | | + | <i>Nemacystus decipens</i> | | Kitamura et al., 1992 |
| <i>Pecten maximus</i> | hépatopancréas/ glandes digestives | + | <i>Ascophyllum nodosum</i> | 2,5 à 1417 | Daniel et al., 1999; Bertheau et al., 2002 |

| | | | | | |
|---------------------------------------|------------------|-----------|--|------|-----------------------|
| <i>Peronidia venulosa</i> | hépatopancréas | 240 à 260 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | ++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Peronidia venulosa</i> | tige cristalline | 10 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Sppisula sachalinensis</i> | hépatopancréas | 20 à 100 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | +++ | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Sppisula sachalinensis</i> | tige cristalline | 30 à 50 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | - | Burtseva et al., 2000 |
| ECHINODERMATA | | | | | |
| <u>Holothuroidea</u> | | | | | |
| <i>Apostichopus japonicus</i> | tous | 90 | <i>F. evanescens</i> | - | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Eupentacta fraudatrix</i> | tous | 20 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | ++ | Burtseva et al., 2000 |
| <u>Echinoidea</u> | | | | | |
| <i>Echinocardium cordatum</i> | système digestif | 630 | <i>L. cicchorioides</i> | - | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Scaphechinus griseus</i> | système digestif | 20 à 60 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | - | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Scaphechinus mirabilis</i> | système digestif | 20 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | - | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Strongylocentrotus intermedius</i> | système digestif | 60 | <i>F. evanescens</i> | - | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Strongylocentrotus nudus</i> | système digestif | 20 à 30 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | - | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Strongylocentrotus pallidus</i> | système digestif | 31 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2003 |
| <u>Crinoidea</u> | système digestif | 92 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2003 |
| <u>Asteroidea</u> | | | | | |
| <i>Asterias amurensis</i> | système digestif | 70 | <i>F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |
| <i>Distolasterias aligans</i> | système digestif | 159 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2003 |
| <i>Distolasterias nipon</i> | système digestif | 20 | <i>F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2003 |
| <i>Hencricia sp.</i> | système digestif | 17 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2003 |
| <i>Leptasterias arctica</i> | système digestif | 149 | <i>F. evanescens</i> | n.d. | Kusaykin et al., 2003 |
| <i>Lysastrosoma anthosticta</i> | système digestif | 40 | <i>F. evanescens</i> | - | Burtseva et al., 2001 |
| <i>Patiria pectinifera</i> | système digestif | 10 à 20 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2002 |
| CHORDATA | | | | | |
| <u>Ascidacea</u> | | | | | |
| <i>Botryllus tuberatus</i> | tous | 10 à 50 | <i>L. cicchorioides, F. evanescens</i> | + | Burtseva et al., 2000 |

Le pH optimal pour l'activité de la fucoïdane hydrolase et de la fucosidase varie selon le type d'organisme la produisant. Les fucoïdane hydrolases présentes chez les invertébrés marins sont principalement actives à pH légèrement acide (~4,5 à 5,4), alors que celles présentes chez les bactéries sont actives à pH neutre (~7) (Tanaka et al., 1970 ; Kusaykin et al., 2003). L'enzyme présente au niveau des invertébrés peut aussi être présente sous deux formes, une

active à pH acide et une autre active à pH basique (~8,5), mais dont la spécificité au niveau du substrat variera (Kusaykin et al., 2003). La fucosidase des invertébrés marins, pour sa part, est principalement active à pH acide (entre 2 et 5,4) (Tanaka et al., 1970 ; Kusaykin et al., 2003).

Chez les microorganismes, la découverte d'enzymes par l'utilisation d'un milieu de culture adéquat est ardue parce que le milieu doit favoriser la croissance de la bactérie de même que sa production de l'enzyme. L'ajout de glucose ou de xylose à une concentration de 1 à 5 g/l stimule l'activité des enzymes dégradant le fucoïdane. Cette stimulation de l'activité est provoquée par l'une augmentation de la croissance bactérienne s'accompagnant d'une stimulation de la quantité de protéines produite et donc d'enzymes produites (Urvantseva et al., 2006).

L'activité des enzymes peut être identifiée et quantifiée par plusieurs tests, tels que la réduction de la viscosité (Kitamura et al., 1992 ; Furukawa et al., 1992), l'augmentation des sucres réducteurs (Yaphe et Morgan, 1959 ; Thanassi et Nakada, 1967), la précipitation avec l'albumine (Berteau et Mulloy, 2003), l'exclusion par chromatographie selon la taille ou l'utilisation d'un substrat chromogénique (Daniel et al., 1999).

1.3. Activité biologique des fucoïdanes

1.3.1. Activité anticoagulante et antithrombotique

Le fucoïdane, comme l'héparine, est en mesure d'inhiber l'activité de la thrombine, soit en agissant directement au niveau de cette enzyme ou en activant des inhibiteurs de la thrombine, tels que le cofacteur II de l'héparine et l'antithrombine. À cet égard, des recherches sur du plasma humain contenant de la thrombine ont révélé que certains fucoïdanes extraits des algues brunes présentent une activité anticoagulante causée par l'interaction du fucoïdane avec la thrombine (Grauffel et al., 1989 ; Kuznetsova et al., 2003). Par ailleurs, des études ont démontré que le fucoïdane de *Fucus vesiculosus* est en mesure de stimuler le cofacteur II de l'héparine par allostérie grâce à son domaine N-terminal acide (Barroso et al., 2008). Cette stimulation du cofacteur II provoque l'inhibition de l'activation de la thrombine, réduisant la coagulation. Par ailleurs, le fucoïdane de *F. evanescens*, en se liant à l'antithrombine, stimule cet inhibiteur de plusieurs protéases de la coagulation (facteurs VIIa, XIa, IXa, Xa et la thrombine) (Barroso et al., 2008). Les mêmes résultats ont été obtenus lors de recherche *in vivo* sur des souris par l'injection intrapéritonéale de 5 mg/kg de fucoïdane (Kuznetsova et al.,

2003). Les fucoïdanes extraits d'*Eklonia kurome*, *Pelvetia caniculata* et *Ascophyllum nodosum*, interagissent au niveau des deux inhibiteurs (Barroso et al., 2008). Certains fucoïdanes ne présentent pas d'activité anticoagulante au niveau du sang *in vitro*, mais, injectés *in vivo*, ils présentent une activité antithrombotique par stimulation de la production d'héparan sulfate. À cet égard, une activité antithrombotique chez des rats a été démontrée à la suite de l'injection de fucoïdane purifié de *Spatoglossum schröderi* pour toutes les voies d'administration (intramusculaire, intrapéritonéale et intraveineuse) à l'exception de la voie orale. Cette activité est dose-dépendante avec un seuil de saturation autour de 20 µg/g de poids du rat et est aussi temps-dépendante avec un seuil de saturation après 16 heures d'administration. La présence d'unités de xylose non sulfatés aux extrémités non réductrices empêche possiblement l'interaction du fucoïdane avec les protéases de la coagulation, expliquant l'absence d'activité anticoagulante *in vitro* (Barroso et al., 2008).

La conformation du fucoïdane, son hétérogénéité, son poids moléculaire, de même que sa proportion en sulfate et fucose et leur position font varier l'efficacité anticoagulante et antithrombotique de ce polysaccharide (Becker et al., 2007 ; Barroso et al., 2008 ; Pereira et al., 1999). L'activité anticoagulante diminue par suite d'une diminution du poids moléculaire du fucoïdane (Soeda et al., 1993).

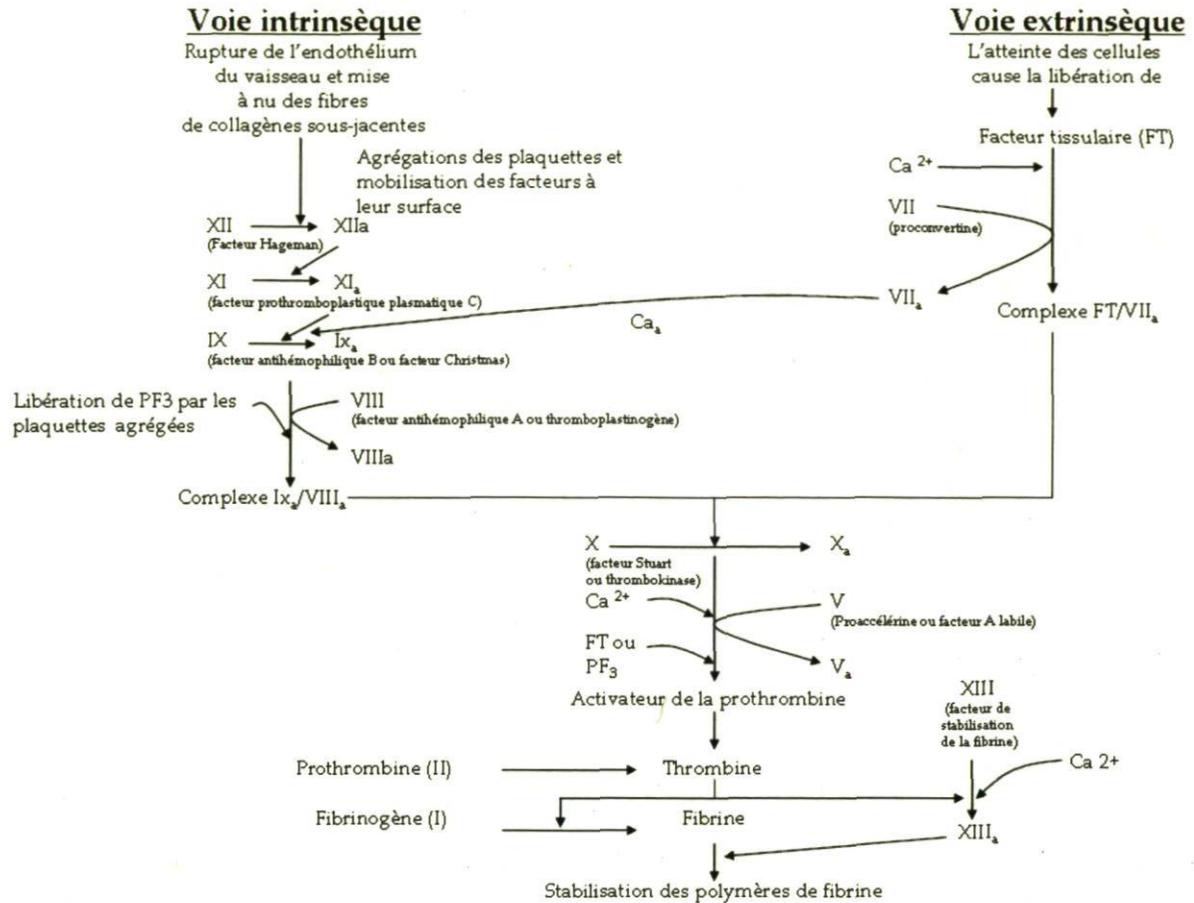


Figure 3- Voie de la coagulation sanguine (Marieb., 1999)

1.3.2. Activité antioxydante

De nouveaux produits antioxydants sont de plus en plus recherchés par les industries pharmaceutiques et alimentaires à cause de leur effet bénéfique contre le développement de cancer, le vieillissement, de même que le rancissement des aliments. En effet, les espèces réactives oxygénées (ROS) tels que les radicaux libres de l'anion superoxide ($\bullet\text{O}_2^-$), le radical hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) et le peroxide d'hydrogène, peuvent causer de l'inflammation, de la mutagenèse et être la cause de cancer, de la maladie d'Alzheimer, de maladies cardiovasculaires, d'accidents cérébro-vasculaires, d'arthrite rhumatoïde ou de cataractes lorsque leur génération est incontrôlée et crée un stress oxydant. Les radicaux libres sont générés par le métabolisme ou par des facteurs externes tels que des médiateurs de la carcinogenèse, de l'inflammation, ou d'ischémie et sont éliminés grâce à des enzymes telles que la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Wang et al., 2008).

De plus, les antioxydants sont des molécules qui peuvent se lier aux radicaux libres et donc inhiber leurs effets au niveau des structures biologiques. À l'heure actuelle, la plupart des antioxydants disponibles sont synthétiques, tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT), mais ceux-ci présentent certains effets toxiques et cancérigènes limitant leur usage. Par conséquent, l'usage d'antioxydants naturels tel que le fucoïdane est souhaitable (Wang et al., 2009).

Le fucoïdane est en mesure de se lier aux anions superoxydes et aux radicaux hydroxyles et donc d'inhiber leur effet au niveau des cellules. Cette activité antioxydante est dépendante du poids moléculaire, du degré de sulfatation, du type de sucres présent, des branches glycosidique et des groupements de substitution tels que la phosphorylation, l'acétylation, l'amination et l'ajout de benzoate (Wang et al., 2008 ; Wang et al., 2009). La concentration de fucoïdane de faible poids moléculaire extrait de *Laminaria japonica* permettant une inhibition de 50 % des radicaux libres (EC_{50}) varie selon la modification apportée au niveau de sa composition. Elle est de 0,004 mg/mL pour le fucoïdane avec ajout de benzoate (PHDF), de 0,008 mg/mL pour le fucoïdane ayant subi une amination (NDF), de 0,009 pour le fucoïdane sursulfaté (SDF), de 0,01 pour le fucoïdane phosphorylé par la méthode $POCl_3$ (PDF-1), de 0,0105 pour le fucoïdane phosphorylé par la méthode acide polyphosphorique (PDF-2) et le fucoïdane natif (DFPS) et de 0,013 pour le fucoïdane acétylé (ADF). La présence de groupements acétyle et benzyle peut possiblement changer la polarité du fucoïdane et modifie son effet au niveau des radicaux libres (Wang et al., 2009). Par ailleurs, l'étude d'Ajisaka et collaborateurs (2009) a démontré qu'au moins un groupement aminé, carboxyle, carbonyle ou sulfaté est requis pour l'activité antioxydant, mais que ces groupements ne peuvent à eux seuls expliquer l'activité antioxydante. L'utilisation d'un fucoïdane non digéré de haut poids moléculaire n'est pas en mesure de séquestrer les ROS intracellulaires des cellules HT1080 contrairement au fucoïdane digéré démontrant l'importance du poids moléculaire dans l'activité antioxydante (Ye et al., 2005).

In vitro, le fucoïdane de *F. vesiculosus* a démontré un pouvoir antioxydant lors du test FRAP et du DPPH et pourrait éventuellement être utilisé comme antioxydant naturel dans l'industrie alimentaire (Rupérez et al., 2002 ; Ajisaka et al., 2009). Par ailleurs, des oligosaccharides de fucoïdane de *F. vesiculosus* ont démontré une activité inhibitrice au niveau de la synthèse des radicaux hydroxyles et de l'hémolyse, de même qu'une chélation de 43,4 % des ions Fe_{2+} lors d'une utilisation de 12,8 mg de fucoïdane (Wang et al., 2007). Les ions Fe_{2+} libres induisent

la génération de radicaux libres, et leur chélation a donc un effet inhibiteur au niveau du stress oxydatif. Par contre, l'utilisation d'oligosaccharides de fucoïdane de *F. vesiculosus* n'a démontré aucun effet inhibiteur au niveau de la synthèse d'anions superoxydes et de la peroxydation des lipides (Wang et al., 2007) contrairement au fucoïdane intact (Rocha de Souza et al., 2007). Un IC₅₀ de 0,058 mg/mL a été obtenu au niveau de l'inhibition de la formation de superoxide, de 1,250 mg/mL au niveau de la peroxydation et de 0,157 mg/mL au niveau du radical hydroxyl lors de l'utilisation de fucoïdane intact (Rocha et Souza et al., 2007). L'hydrolyse du fucoïdane par une irradiation aux rayons gamma semble augmenter son effet antioxydant tel que démontré par une augmentation lors du test du DPPH passant de 59,2 % pour le fucoïdane intact à 89 % pour le fucoïdane exposé à 50kGy, ainsi qu'une augmentation du pouvoir réducteur (Choi et al., 2009)

Le carbonetetrachloride (CCL₄) est fréquemment utilisé comme inducteur de cirrhose du foie à cause que son clivage en ions chlorides et en radicaux CCl₃ qui est ensuite converti en CCl₃O₂ réagit avec les acides gras de la membrane lipidique, ce qui conduit à un stress oxydatif et à l'accumulation de la malondialdéhyde (MDA) qui cause des hépatotoxicités. L'accumulation de la malondialdéhyde a aussi un effet inhibiteur au niveau des enzymes antioxydatives SOD, CAT et GPx. Par ailleurs, l'augmentation des niveaux du lactate déshydrogénase (LDH), d'oxaloacétate transaminase (GOT), de glutamate pyruvate transaminase (GPT) et d'alcalines phosphatases (ALP) sont des marqueurs de dommage au foie. *In vivo*, l'injection intrapéritonéale de 100 mg/kg des fucoïdanes de *L. japonica* et d'*U. pinnatipida* réduit respectivement de 84,8 % et 71,7 % le niveau de LDH, de 40 % et 55,61 % le niveau de GOT, de 49,02 % et 58,25 % le niveau de GPT et de 40 % et 52,5 % le niveau d'ALP chez des rats comparativement à celles n'ayant eu que l'injection de CCL₄. La MDA est inhibée respectivement par les fucoïdanes de *L. japonica* et d'*U. pinnatipida* de 80,16 et 79,98 % au niveau du foie et de 79,03 et 84,19 % au niveau mitochondrial. Par ailleurs, le fucoïdane stimule l'activité des enzymes de protection contre les ROS. Une augmentation respective de l'activité de CAT par les fucoïdanes de *L. japonica* et d'*U. pinnatipida* de 26,10 % et de 20,09 % au niveau du foie et 59,27 et de 65,94 % au niveau mitochondrial a été observée chez les rats. La GPx est stimulée de 41,26 % et de 46,70 % au niveau du foie par les fucoïdanes de *L. japonica* et d'*U. pinnatipida* et de 46,14 % et de 44,18 % au niveau mitochondrial. Par ailleurs, une diminution de la cirrhose et de la nécrose des veines centrolobulaires et des sinusoides hépatiques a été observée lors de l'utilisation de fucoïdane (Kang et al., 2008).

1.3.3. Activité antitumorale, immunomodulatoire et radioprotecteur

Le fucoïdane pourrait être un médicament utilisé dans la lutte contre le cancer parce qu'il est non toxique pour l'humain, qu'il stimule les réactions immunitaires spécifiques et non spécifique de l'organisme, inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins irriguant la tumeur, nuit à l'attachement des cellules cancéreuses et à leur prolifération, provoque l'apoptose des cellules cancéreuses et a un effet radioprotecteur. L'activité du fucoïdane dans la lutte contre le cancer est dépendante de son poids moléculaire, de son degré d'acétylation, de sulfatation et de leur positionnement sur la chaîne.

In vitro, l'utilisation d'une concentration de fucoïdane de *F. vesiculosus* variant entre 10 et 100 µg/mL stimule la viabilité et l'effet cytotoxique des lymphocytes et des macrophages de souris. Les fucoïdanes de *F. vesiculosus* et de *Cladosiphon okamuranus* stimulent l'activité antitumorale des macrophages en augmentant la phagocytose, l'activité lysosomale de la phosphatase et de la myeloperoxydase, la production de H₂O₂, d'oxyde nitrique, de même que par la sécrétion de cytokines, plus précisément l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) (Choi et al., 2005 ; Teruya et al., 2009). La production d'oxyde nitrique est stimulée par le fucoïdane par l'activation de son promoteur via les voies de la « p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) » et du NF-κB grâce aux récepteurs membranaires de type toll 4 (TLR4), aux clusters de différenciation 14 (CD14) et aux récepteurs scavenger de classe A (SRA). Une désulfatation ou une déacétylation entraîne une diminution importante de la production d'oxyde nitrique démontrant l'importance de ces groupements ou de la conformation du polysaccharide lors de la liaison aux récepteurs de la voie MAPK (Teruya et al., 2009). Par ailleurs, l'activité antitumorale du fucoïdane est aussi causée par la stimulation de l'activité estérase de la granzyme A (GzmA) des lymphocytes T et NK qui induit la lyse des cellules tumorales ainsi que la libération de cytokines IL-β, IL-6 et IL-8 (Hirayasu et al., 2005). Le fucoïdane a aussi un effet stimulateur de la viabilité des cellules dendritiques, de leur production d'IL-12 et du TNF-α, ainsi qu'au niveau de l'expression des complexes d'histocompatibilité de classe I, II, CD54 et CD86.

In vivo, l'ingestion de 0,034 g/jour de fucoïdane d'*U. pinnatifida* chez des souris crée une inhibition de 65,4 % de la tumeur, une activation des cellules tueuses (NK) et une

augmentation de l'IFN- γ (Maruyama et al., 2006). De plus, trois injections intrapéritonéales de 10 mg/kg de fucoïdane de *F. vesiculosus* entraînent une inhibition plus importante du poids de la tumeur et du nombre de métastases chez des souris comparativement à une seule injection de 25 mg/kg, démontrant l'importance du nombre d'injections (Alekseyenko et al., 2007).

L'inhibition de l'angiogenèse cause une diminution dans l'apport en nutriments et en oxygène nécessaire au développement et à la dissémination ultérieure de la tumeur. *In vitro*, l'addition de 100 μ g/mL des fucoïdanes de *L. saccharina*, *L. digitata*, *F. evanescens*, *F. serratus* et *F. distichus* inhibe de 99 % la formation de nouveaux vaisseaux à partir de cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC), alors que les fucoïdanes de *C. okamuranus* et *F. vesiculosus* ne présentent pas d'activité inhibitrice (Cumashi et al., 2007). D'une part, cette inhibition de l'angiogenèse par les fucoïdanes serait causée par une suppression de l'expression et de la sécrétion des facteurs de l'angiogenèse comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). D'autre part, par l'interférence du fucoïdane au niveau de la liaison du VEGF et du facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) avec leurs récepteurs respectifs. Enfin, le fucoïdane entraînerait une diminution de l'excrétion et la séquestration du H₂O₂ qui stimule l'expression du VEGF (Soeda et al., 2000 ; Koyanagi et al., 2003 ; Ye et al., 2005). L'augmentation du degré de sulfatation du fucoïdane augmente le pouvoir inhibiteur de la formation de l'angiogenèse par la tumeur (Koyanagi et al., 2003). *In vivo*, l'injection de 5 mg/mL fucoïdane chez les souris réduit de façon significative la néovascularisation induite par le cancer tout comme le volume de la tumeur (Koyanagi et al., 2003).

La formation de métastases est étroitement reliée à la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM) par les métalloprotéinases matricielles (MMPs) des cellules tumorales, principalement les MMPs-2 et -9 de même qu'à l'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire du site secondaire. L'utilisation de fractions hydrolysées de fucoïdane de *Cladosiphon novae-caledoniae kylin* démontre un effet inhibiteur dans l'invasion des cellules cancéreuses responsables des métastases parce qu'il inhibe la transcription de MMP-2 dans les cellules HT1080, de même que l'expression de MMPs-2 et -9. De plus, la pénétration des cellules au niveau de la matrice est aussi diminuée suite à l'utilisation de fucoïdane. Cet effet inhibiteur pourrait être expliqué par l'effet antioxydant du fucoïdane car l'expression de MMP-2 et -9 semble corrélée au stress oxydatif présent au niveau des cellules tumorales (Ye et al., 2005). Par ailleurs, les fucoïdanes de *L. saccharina*, *L. digitata*, *F. vesiculosus*, *F. serratus* et *F.*

distichus sont en mesure de réduire de 80 % l'adhésion entre les cellules tumorales MDA-MB-231 du cancer du sein et les plaquettes humaines. Les fucoïdanes de *F. evanescens* et *A. nodosum* présentent pour leur part une inhibition respective de 78 % et 66 %. Les fucoïdanes de *C. okamuranus* et *F. spiralis* n'ont pas d'effet inhibiteur au niveau de l'attachement des cellules cancéreuses (Cumashi et al., 2007). Le fucoïdane inhibe l'adhésion des cellules MDA-MB-231 à la fibronectine pas sa liaison avec la fibronectine, par son effet modulateur de l'organisation de la sous-unité de l'intégrine α -5 et par une diminution de l'expression de la vinculine (Liu et al., 2005). L'activité antiadhésive est dose dépendante avec un seuil de saturation autour de 400 μ g/mL (Rocha et al., 2005). L'inhibition de l'adhésion et de l'invasion des cellules tumorales par le fucoïdane est corrélée à son poids moléculaire, sa structure carbonée, son orientation spatiale, ainsi que ses groupements sulfate (Liu et al., 2005 ; Rocha et al., 2005). Par conséquent, la désulfatation et un faible poids moléculaire entraînent une diminution de l'activité inhibitrice du fucoïdane au niveau de l'attachement des cellules cancéreuses aux fibronectines (Liu et al., 2005 ; Rocha et al., 2005).

L'apoptose est le processus de mort cellulaire en réponse à un signal et est gouvernée par deux voies principales d'activation, soit une voie extrinsèque impliquant les récepteurs au TNF et une voie intrinsèque impliquant les Bcl-2. Les deux voies d'activation produisent l'activation des caspases responsables de l'arrêt de la réplication, de la fragmentation du noyau et du cytosquelette et l'exposition de phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire. Par contre, au niveau des cellules cancéreuses, le phénomène d'apoptose ne fonctionne plus, conduisant à une prolifération excessive de ces cellules. Le fucoïdane agit comme inducteur de l'apoptose des cellules cancéreuses et favorise la phagocytose des cellules mortes (Cumashi et al., 2007 ; Philchenkov et al., 2007). Tout d'abord, le fucoïdane stimule de façon dose-dépendante l'activation des caspases effectrices 3 et 7 provoquant l'apoptose des cellules cancéreuses U937 et HS-Sultan (Aisa et al., 2005 ; Teruya et al., 2007). D'ailleurs, l'utilisation de 100 μ g/mL de fucoïdane sursulfaté de *C. okamuranus* réduit de 90 % la viabilité des cellules U937 (Teruya et al., 2007). Le fucoïdane agit aussi au niveau de l'expression de CXCL12 au niveau de son récepteur CXCR4 grâce à sa liaison à CXCL12. Il a été démontré que la liaison de CXCL12 à CXCR4 peut induire la prolifération des cellules tumorales dans les cancers du cerveau, des ovaires, du poumon, de la prostate, du pancréas, du foie et du larynx. L'utilisation de 1 mg/mL de fucoïdane diminue l'expression de de l'ARN messager du gène CXCL12 au niveau des cellules Huh7 et provoque l'arrêt du cycle

cellulaire et l'apoptose. Un IC_{50} est obtenu respectivement lors de l'utilisation de 2 et 4 mg/mL de fucoïdane au niveau des cellules Huh7 et HepG2. De plus, une réduction significative du niveau de l' α -foetoprotéine, qui est un marqueur tumoral chez l'adulte, est obtenue au niveau des cellules Huh7 (Nagamine et al., 2009). Au niveau d'ERK et GSK, qui sont des kinases impliquées dans la division, la croissance et la prolifération cellulaire, de même que dans la réparation de l'ADN, le fucoïdane de *F. vesiculosus* réduit la phosphorylation nécessaire à leur activation, diminuant par le fait même leur activité au niveau de la prolifération des cellules cancéreuses. Le fucoïdane est aussi en mesure de se lier au facteur de croissance épidermique (EGF) qui induit une activité mitotique des cellules lorsqu'elle se fixe à son récepteur (EGFR) et induit la phosphorylation de ce dernier (Lee et al., 2008). En effet, la liaison d'EGF au récepteur EGFR induit une cascade de réactions protéiques intracellulaires conduisant à la formation d'ERK et JNK, qui stimulent l'activité d'AP-1 responsable de la différenciation et de la prolifération des cellules. La liaison du fucoïdane à EGF inhibe sa liaison au récepteur et donc son action au niveau de la prolifération cellulaire. Enfin, le fucoïdane rend les cellules lymphoïdes malignes sensibles à l'étoposide, qui est une molécule inhibant la topoisomérase II, et qui est utilisée comme traitement contre les cancers (Philchenkov et al., 2007). L'activité apoptotique du fucoïdane semble liée à son degré de sulfatation et à la position des sulfates parce que le fucoïdane natif de *C. okamuranus* ne provoque pas l'apoptose contrairement au fucoïdane sursulfaté (Teruya et al., 2007). L'activité antitumorale est aussi dépendante du poids moléculaire, passant de 37,6 % pour le fucoïdane natif d'*U. pinnatifida* à 75,9 % pour le fucoïdane hydrolysé (Yang et al., 2008). Cette augmentation de l'activité anti tumorale avec la diminution du poids moléculaire est liée à une plus grande mobilité et diffusion du fucoïdane jusqu'aux tissus.

La moelle osseuse contient une multitude de cellules nécessaires au système immunitaire et à l'hématopoïèse. Son exposition aux radiations ionisantes entraîne des dommages importants à ces cellules et une immunosuppression. Par conséquent, la protection des cellules de la moelle osseuse (BMC) est souhaitable lors d'une radiothérapie utilisée dans le traitement du cancer. Le fucoïdane a démontré un effet radioprotecteur au niveau des BMC. *In vitro*, une augmentation de la viabilité des BMC irradiés a été observée lors de l'utilisation de 10 à 50 μ g/ml de fucoïdane passant de 15 % à 62 % lors de l'utilisation de fucoïdane. De plus, une diminution de l'apoptose des cellules BMC a aussi été observée par suite de l'utilisation de fucoïdane (Byon et al., 2008). *In vivo*, une injection intrapéritonéale de 100 mg/kg de fucoïdane avant le traitement de radiothérapie à 9Gy entraîne une augmentation de la survie

chez des souris après 30 jours à un taux de 67 %. De plus, la survie respective des souris à la suite de traitements à 6, 8 et 10 Gy est de 100 %, 70 % et 56 % avec l'injection de fucoïdane comparativement à 90 %, 10 % et 0 % sans l'injection de ce polysaccharide. La survie des cellules de la moelle épinière est aussi influencée par l'injection de fucoïdane. À la suite de l'irradiation, 4,46 ($0,79 \times 10^6$ cellules/fémur) ont survécu sans l'injection de fucoïdane comparativement à 8,36 ($0,59 \times 10^6$ cellules/fémur) (Lee et al., 2008).

1.3.4. Activité anti-inflammatoire

Le recrutement des leucocytes comme les neutrophiles permet d'inactiver les micro-organismes, mais leur présence dans certains tissus peut causer des lésions importantes aux organes pouvant aller jusqu'au syndrome de choc septique. La régulation du recrutement des leucocytes est donc souhaitable dans certaines pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, la parodontite, la péritonite, la méningite et certaines réactions allergiques. Les fucoïdanes de plusieurs espèces d'algues inhibent le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation par leur impact au niveau des sélectines, leur inhibition de la synthèse de cytokines inflammatoires et des métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Nasu et al., 1997 ; Senni et al., 2006 ; Cumashi et al., 2007). Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle dans l'inflammation en créant des interactions faibles et transitoires entre les cellules endothéliales et les leucocytes, alors que les MMPs sont des endopeptidases qui dégradent les macromolécules de la matrice cellulaire.

L'injection intraveineuse de 0,6 mg/h de fucoïdane de *F. vesiculosus* permet de réduire 75 % la migration de neutrophiles au niveau du foie, du poumon, de la cavité abdominale et du cerveau chez des rats atteints de péritonite, sans pour autant entraîner une augmentation du compte microbien au niveau de ces organes (Linnemann et al., 2000). De plus, le fucoïdane de *L. saccharina* réagit avec les L- et P-sélectines, diminuant l'infiltration des neutrophiles dans la cavité abdominale et la possibilité de développer une péritonite (Preobrazhenskaya et al., 1997 ; Ushakova et al., 1999).

Le traitement de la méningite avec des antibiotiques induit la libération de résidus bactériens nuisibles au niveau de l'espace subarachnoïdien. Ceci stimule l'inflammation au niveau des méninges, le recrutement de leucocytes dans le fluide cérébrospinal et la production de produits cytotoxiques qui sont davantage nuisibles que bénéfiques pour l'organe. Le

fucoïdane, par sa liaison à la L-sélectine, permet de réduire l'extravasation des leucocytes dans le fluide cérébrospinal durant la méningite. Le fucoïdane diminue aussi le niveau d'IL-1 et de protéines plasmatiques. Enfin, les changements induits par l'inflammation telles que l'augmentation de pression intracrânienne, du contenu en eau du cerveau et du flux sanguin sont inhibés par l'injection intraveineuse de fucoïdane (Granert et al., 1993 ; Angstwurn et al., 1995 ; Granert et al., 1998 ; Granert et al., 1999 ; Ostergaard et al., 2000). Par ailleurs, la diminution du recrutement de leucocytes n'entraîne pas d'augmentation du nombre de bactéries au niveau du fluide cérébrospinal et du sang (Ostergaard et al., 2000).

L'encéphalopathie hypoxique ischémique est une des principales causes de dommages permanents du cerveau immature, pouvant résulter en une mort néonatale, des retards mentaux, de l'épilepsie et des infirmités motrices cérébrales. Les principaux responsables des dommages sont l'accumulation de calcium intracellulaire, la peroxydation des lipides, la génération de radicaux libres et le recrutement de cellules inflammatoires. Le fucoïdane par son effet inhibiteur de l'adhésion des leucocytes par les L et P-sélectines et par son impact au niveau de la production de myéloperoxydase joue un rôle neuroprotecteur (Uhm et al., 2003).

L'hypersensibilité est causée par une réponse immunitaire à de faibles niveaux d'antigène et elle est la cause d'allergies et de maladies auto-immune. Les réactions d'hypersensibilité de type 1, incluant l'asthme, la rhinite allergique, l'eczéma, l'urticaire et l'anaphylaxie sont causées par les immunoglobines E (IgE) et requièrent les lymphocytes T-auxiliaire de type 2 (Th2) qui produisent les cytokines 4, 5, et 13 (IL-4,5,13) de même que l' γ -interféron (IFN- γ). L'IL-4 est le facteur principal contrôlant la production d'IgE et est étroitement lié à l'IL-13 qui cause une hyperréactivité au niveau des voies respiratoires et stimule la production d'IgE. L'IL-5, pour sa part est un régulateur des éosinophiles. Les éosinophiles sont présents en nombre élevé lors d'une réaction allergique et causent des dommages aux tissus par leur sécrétion de protéines cationiques, de médiateurs lipidiques, de cytokines et de radicaux libres. Une diminution dans la synthèse des cytokines des lymphocytes Th2 entraînera une diminution des réactions allergiques par un contrôle de la réaction immunitaire. À cet égard, l'injection intrapéritonéale de 50 mg/kg de fucoïdane d'*U. pinnatifida* permet de réduire l'inflammation pulmonaire à la suite d'une réaction allergique chez les souris par une diminution des cytokines de Th2 (Maruyama et al., 2005). La production d'IgE induite par l'IL-4 est réduite *in vitro* par l'utilisation du fucoïdane (Oomizu et al., 2006). De plus, une diminution du nombre d'éosinophiles, de même qu'une inhibition de la production de mucus

par les cellules épithéliales pulmonaire ont été observées à la suite de l'injection péritonéale de fucoïdane (Maruyama et al., 2005). Par ailleurs, l'injection intraveineuse de fucoïdane de *F. vesiculosus* et *L. variegata* permet de réduire l'œdème et l'infiltration de leucocytes au niveau des oreilles chez des souris par suite de l'administration d'haptène ou d'huile de croton qui causent une réaction inflammatoire (Nasu et al., 1997 ; Medeiros et al., 2008). Une inhibition de 46,8 % de la réaction d'hypersensibilité est observée à la suite de l'injection intraveineuse de 100 mg/kg du fucoïdane. Cette inhibition semble reliée à l'effet inhibiteur du fucoïdane sur l'adhésion des leucocytes par la L-sélectine (Nasu et al., 1997).

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont influencées par la synthèse de l'interleukine-6 (IL-6) et peuvent être diminuées par l'ingestion de fucoïdane. *In vitro*, le fucoïdane de *C. okamuranus* Tokida et de *K. crassifolia* inhibe la production d'IL-6 par les cellules CMT-93 grâce à une inhibition de la translocation nucléaire de NF- κ B. *In vivo*, l'activité de la myéloperoxidase, la synthèse de l'IL-6, de même que les effets de la pathologie chez des souris sont diminués suite à l'ingestion de fucoïdane de *C. okamuranus*. Par contre, aucun effet *in vivo* n'a été démontré pour le fucoïdane de *K. crassifolia* possiblement dû à la structure différente du fucoïdane.

Le fucoïdane permet de protéger la matrice extracellulaire contre la dégradation incontrôlée observée lors de certaines pathologies inflammatoires. L'utilisation de fucoïdane d'*A. nodosum* permet de réduire *in vitro* l'induction par l'interleukine-1 (de la gélatinase (MMP2) et de la stromélysine (MMP3) qui dégradent respectivement le collagène de type I et les constituants de la lame basale. De plus, le fucoïdane augmente l'association des MMPs avec leurs inhibiteurs spécifiques (TIMPs). *Ex vivo*, le fucoïdane protège l'élastine contre la protéolyse par l'élastase (Senni et al., 2006).

L'infiltration de leucocytes est aussi étroitement liée aux dégâts causés lors de la reperfusion d'un organe à la suite d'une ischémie. En effet, la présence de cellules immunitaires entraîne la formation de sténose au niveau des vaisseaux sanguins et la synthèse de produits cytotoxiques sont néfastes pour l'organe touché. *In vitro*, les polysaccharides extraits de *L. saccharina*, *L. digitata*, *F. evanescens*, *F. serratus*, *F. distichus*, *F. spiralis*, *F. vesiculosus* et *A. nodosum* inhibent l'action des P-sélectines dans l'adhésion des neutrophiles aux plaquettes permettant une diminution de la formation de sténose (Cumashi et al. 2007 ; Bachelet et al., 2009). L'effet inhibiteur du fucoïdane repose sur la formation d'un complexe entre le

fucoïdane et les P-sélectines (Bachelet et *al.*, 2009). *In vivo*, une perfusion de fucoïdane dans le myocarde permet de supprimer l'infiltration de neutrophiles et l'activité de la myéloperoxydase à la suite d'une ischémie (Kubes et *al.*, 1995 ; Omata et *al.*, 1997). L'injection de 25 mg/kg fucoïdane permet d'augmenter la viabilité chez des rats suite à une ischémie, passant de 44 % à 88 % et diminue respectivement de 90 % et de 50 % le recrutement et l'attachement de leucocytes chez des chats (Kubes et *al.*, 1995 ; Cetin et *al.*, 2001).

1.3.5. Activité anticomplément

Le système du complément constitue un ensemble de protéines plasmatiques présentes normalement dans le sang sous leurs formes inactives et constituant l'immunité non spécifique du corps. Il stimule l'inflammation et l'opsonisation, facilite la phagocytose et lyse certaines cellules. Il comprend les protéines C1 à C9, les facteurs B, D et P ainsi que quelques protéines régulatrices. La protéine centrale de la cascade d'activation protéique est la protéine C3 et peut être activée de deux façons. D'une part, elle peut être activée selon la voie classique par la liaison des anticorps aux antigènes puis à la fixation de ce complexe au facteur C1q ce qui entraîne une cascade d'activation protéique. D'autre part, elle peut être activée par la voie alternative par l'interaction des facteurs B à une protéine C3 (figure 4).

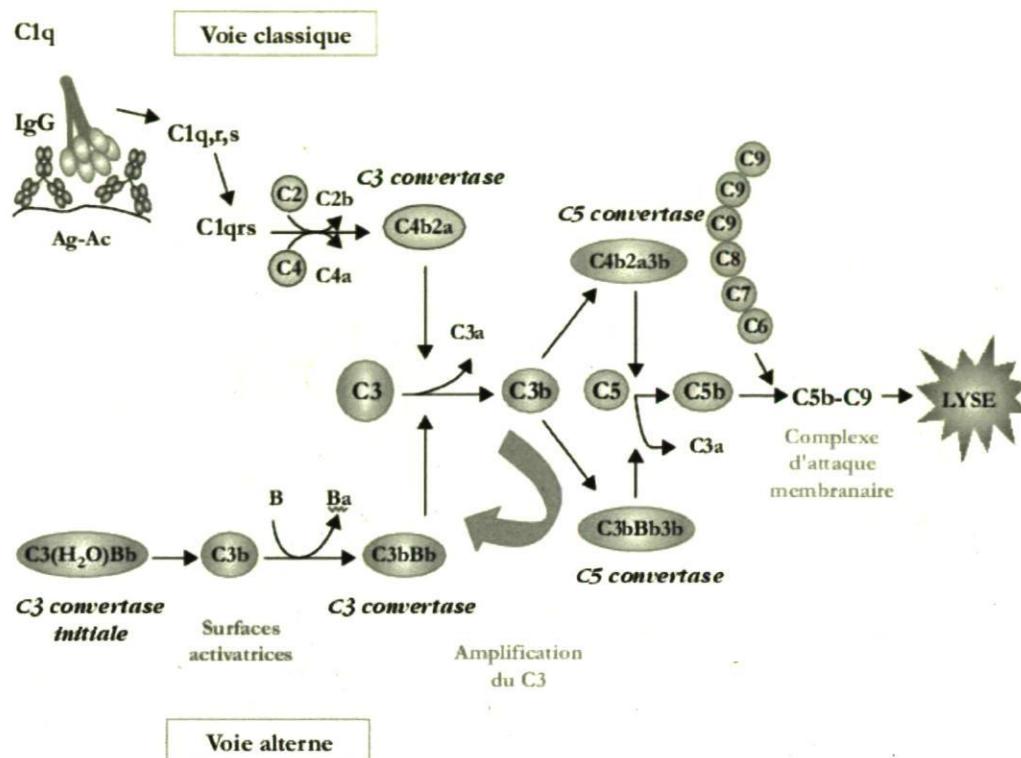


Figure 4- Voies d'activation du complément (Probst et al., 2006)

Le système du complément constitue un des principaux mécanismes de destruction des substances étrangères de l'organisme grâce à son action cytolytique et à sa libération de médiateurs chimiques qui accentuent les aspects de la réaction inflammatoire. Cependant, lors de la transfusion d'organes, il est souhaitable d'inhiber la réaction immunitaire par la prise d'inhibiteurs synthétiques ou naturels qui vont agir au niveau de l'activation du complément. Malheureusement, plusieurs inhibiteurs synthétiques sont toxiques et une forte concentration est nécessaire pour inhiber le système du complément *in vivo*.

Le fucoïdane est un inhibiteur naturel du système du complément qui est efficace à faible dose. Son activité est dépendante du poids moléculaire et de la composition chimique du fucoïdane. L'activation du complément diminue avec l'augmentation du contenu en xylose, en galactose et en acide glucuronique du fucoïdane (Blondin et al., 1996). Les groupements sulfates semblent être nécessaire à l'activité anti-inflammatoire, mais ne peuvent expliquer à eux seuls l'activité du fucoïdane (Blondin et al., 1996). L'activité anticomplément du fucoïdane atteint un plateau pour les fucoïdanes de poids moléculaires supérieurs à 46 800 Da pour ce qui est de la voie classique alors que le plateau est atteint à partir du poids moléculaire

de 13 500 Da pour la voie alternative (Blondin et al. 1996). Le fucoïdane est 40 fois plus actif que l'héparine pour inhiber la voie classique de l'activation de la protéine C3 du complément et est aussi plus actif pour inhiber la voie alternative (Blondin et al., 1996). L'action du fucoïdane au niveau de la voie classique est assurée par sa liaison à la protéine C1q grâce aux résidus lysine. La liaison du fucoïdane à C1q prévient l'association de C1r2-C1s2 nécessaire à l'activation de C1. Par ailleurs, le fucoïdane est aussi en mesure d'inhiber l'activation de C2, C4 et C3, mais n'est pas en mesure d'inhiber l'activation de C5. De plus, l'utilisation de 8 µg/mL permet d'inhiber de 50 % la lyse par le système du complément (Tissot et al., 2003). Au niveau de la voie alternative, le fucoïdane inhibe la liaison du facteur B à C3b et interfère au niveau de la fonction stabilisante de la properdine (Blondin et al., 1994 ; Charreau et al., 1997).

1.3.6. Activité antivirale

De nombreuses études ont démontré que les polysaccharides sulfatés des algues sont non toxiques pour l'humain et présentent des activités antivirales contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les virus de l'herpès de type 1 et 2 (HSV-1, HSV-2), le cytomégalovirus humain (HCMV), le virus de l'influenza, le virus de l'hépatite B (VHB), le virus respiratoire syncytial (RSV), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de Sindbis, le phlébovirus de la fièvre à phlébotome, le virus de la dengue, le virus de Junin (JV), le virus de Tacaribe (TACV), le virus de la peste porcine (ASFV) et le virus de la diarrhée bovine virale (BVDV) (Baba et al., 1988 ; Andrei et De Clercq, 1990 ; Garcia-Villalon et Gil-Fernandez., 1991 ; Béress et al., 1993 ; Iqbal et al., 2000 ; Damonte et al., 2004 ; Adhikari et al., 2006 ; Queiroz et al., 2008). Les polysaccharides sulfatés demeurent non toxiques jusqu'à une concentration cent fois supérieure à celle utilisée pour inhiber les virus (Masanori et al., 1988).

Aucune inhibition n'a été observée pour les virus nus tels que le virus coxsackie B et le poliovirus (Schaeffer et Krylov., 2000 ; Damonte et al., 2004 ; Lee et al., 2004 ; Hidari et al., 2008). Le fonctionnement du fucoïdane dans l'effet antiviral peut expliquer la différence observée au niveau de l'inhibition des virus enveloppés par rapport aux virus nus. Tout d'abord, les polysaccharides sulfatés sont en mesure d'interférer avec l'attachement initial du virus à la cellule cible par compétition avec les récepteurs cellulaires de l'enveloppe virale ou par interaction avec la cellule cible, empêchant de cette façon la pénétration du virus

(McClure et al., 1992 ; Damonte et al., 2004). Le contact initial entre l'enveloppe du virus et la cellule cible est assuré par l'interaction ionique entre les glycoprotéines virales externes chargées positivement et certains constituants de la surface cellulaire chargés négativement. Par conséquent, la charge anionique des groupements sulfate et carboxyle, le degré de sulfatation et la distribution des groupements sulfate dans la chaîne carbonée auront un impact important sur l'activité antivirale parce qu'ils permettront au fucoïdane de compétitionner avec les constituants de la surface cellulaire lors de l'attachement du virus (Schaeffer et Krylov., 2000 ; Damonte et al., 2004). De fait, les polysaccharides sulfatés ayant un degré de sulfatation inférieur à 20 % ne présentent pas d'activité antivirale (Damonte et al., 2004). La linéarité et la flexibilité de la chaîne carbonée, le poids moléculaire, de même que l'influence des sites hydrophobes auront aussi un impact au niveau de l'effet antiviral. D'ailleurs, l'activité antivirale augmente avec le poids moléculaire, avec une valeur maximale autour de 10 à 100 kDa. Le fucose confère au fucoïdane une plus grande activité antivirale que le galactose ou le glucose contenu dans d'autres polysaccharides sulfatés tels que le carraghinane et le dextrane (Damonte et al., 2004). Ensuite, les polysaccharides sulfatés sont en mesure d'inhiber la réplication de certains virus dans la cellule hôte par leur impact au niveau de la transcriptase inverse (Béress et al., 1993; Iqbal et al., 2000 ; Duarte et al., 2004). Enfin, le fucoïdane stimule les réponses spécifiques et non spécifiques du système immunitaire favorisant l'élimination des virus (Cooper et al., 2002 ; Hayashi et al., 2008).

Une inhibition par les fucoïdanes de l'attachement des glycoprotéines 120 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au récepteur CD₄ a été observée au niveau des cellules CEM et varie entre 31 et 95 % selon la fraction de fucoïdane utilisée (Béress et al., 1993). De plus, une concentration de 2,8 µg/mL et 10 µg/mL de fucoïdane de *Fucus vesiculosus* permet de réduire respectivement de 50 % le caractère cytopathogène du virus (MIC₅₀) et réduit de 50 % les effets du virus (IC₅₀) sur les cellules MT-4 (Baba et al., 1988). Par ailleurs, l'utilisation de fucoïdane à une concentration de 0,5 à 1 µg/mL a démontré une inhibition de la transcriptase inverse variant entre 84 % et 99,03 % (Béress et al., 1993 ; Queiroz et al., 2008). La désulfatation et la carboxyréduction du fucoïdane entraînent une perte importante de l'inhibition de la transcriptase inverse démontrant l'importance de la charge anionique des groupements sulfate et de l'orientation spatiale des chaînes de sucres dans l'activité anti-VIH (Witvrouw et de Clerc., 1997 ; Queiroz et al., 2008). En plus de leurs effets directs sur le virus de l'immunodéficience humaine, les polysaccharides sulfatés peuvent agir de façon synergique avec d'autres médicaments anti-VIH tel que l'azidothymidine (AZT), ce qui

permettrait de diminuer l'émergence de mutants résistants tout en utilisant une concentration plus faible de ces deux composés (Witvrouw et de Clerc., 1997 ; Schaeffer et Krylov., 2000).

Le fucoïdane a aussi démontré une activité inhibitrice au niveau de la phase d'adsorption du virus de l'herpès de type 1 et 2. En effet, le fucoïdane, par compétition avec l'héparane sulfate, diminue l'attachement des glycoprotéines virales C (gC) et B (gB) au protéoglycan cellulaire. Par conséquent, l'attachement subséquent de la glycoprotéine virale D (gD) à un ensemble de corécepteurs, permettant la fusion de l'enveloppe virale à la membrane et la pénétration du virus dans la cellule, n'a pas lieu (Damonte et al., 2004; Duarte et al., 2004 ; Adhikari et al., 2006). Les fucoïdanes d'*A. utricularis*, d'*U. pinnatifida*, de *S. marginatum*, d'*U. pinnatifida* et de *C. indica* ont démontré des effets antiviraux contre les virus de l'herpès de type 1 et 2 (Li et al., 2008). *In vitro*, le MIC₅₀ et l'IC₅₀ varient selon le type de virus de l'herpès, du fucoïdane, et des cellules utilisés. À cet égard, une concentration de 1,7 µg/mL de fucoïdane extrait de *F. vesiculosus* a permis l'atteinte du MIC₅₀ pour le virus de l'herpès de type 1 au niveau des cellules rénales de lapin (PRK) tandis qu'une concentration respective de 0,6 et 1,1 µg/mL a été nécessaire pour le virus de l'herpès de type 2 au niveau des cellules de fibroblastes humains (HF) et PRK (Baba et al., 1988, Zeitling et al., 1997). Par ailleurs, lors de l'utilisation de fucoïdane extrait d'*A. utricularis*, l'IC₅₀ pour l'herpès de type 1 et 2 au niveau des cellules VERO est atteint respectivement à une concentration variant entre 1,25 à 2,10 µg/mL et 1,63 à 2,16 µg/mL selon la fraction de fucoïdane utilisée (Ponce et al., 2003). Le fucoïdane de *F. vesiculosus* présente, quant à lui, un IC₅₀ à une concentration respective de 3,1 µg/mL et de 1,6 µg/mL pour les virus de type 1 et 2 au niveau des cellules HF (Cooper et al., 2002). La composition et la longueur de la chaîne carbonée influencent l'activité anti-herpès. À cet égard, le galactofucoïdane extrait d'*A. utricularis* présente une forte inhibition du virus de l'herpès de type 1 et 2 alors que l'uronofucoïdane n'a pas d'activité antivirale (Ponce et al., 2003). Une température élevée lors de l'extraction des fucoïdanes réduit l'activité antivirale possiblement à cause de son poids moléculaire plus faible (Ponce et al., 2003). *In vivo*, l'injection vaginale de 20 mg/mL de fucoïdane de *F. vesiculosus*, dissout dans du tampon phosphate salin, chez des souris, avant l'infection par le virus, permet prévenir totalement l'infection par le virus de l'herpès de type 2 et de réduire de 100 % la présence de lésion (Zeitling et al., 1997). De plus, l'administration orale de 5 mg de fucoïdane d'*U. pinnatifida* pendant 3 semaines protège les souris contre l'infection par le virus de l'herpès de type 1. Cette protection semble être causée principalement par une stimulation par le

fucoïdane des réponses spécifiques et non spécifiques du système immunitaire (Hayashi et al., 2008). Au niveau humain, la consommation d'*U. pinnatifida* démontre des effets inhibiteurs au niveau de la réactivation du virus de l'herpès chez des patients. En effet, la consommation de capsules d'algues par des patients atteints d'herpès latent ou actif a eu un effet positif sur leur guérison et a permis une inhibition des éruptions de cas d'herpès de type 1, 2, de type 2 résistant à l'aciclovir et de zona. Une réduction de la douleur a aussi été observée chez certains patients. Par ailleurs, aucun effet secondaire n'a été observé (Cooper et al., 2002).

Le MIC₅₀ pour le cytomégalovirus au niveau des cellules HeLa est atteint à une concentration de 2 µg/mL de fucoïdane extrait de *F. vesiculosus* (Baba et al., 1988). Une concentration de 1,5 µg/mL et 2,5 µg/mL de fucoïdane extrait d'*U. pinnatifida* permet d'atteindre respectivement l'IC₅₀ au niveau des cellules HeLa et HF lorsqu'il est appliqué en même temps que le virus (Cooper et al., 2002 ; Lee et al., 2004). Cette concentration augmente lorsque le fucoïdane est appliqué après la mise en contact du virus avec les cellules HeLa (Lee et al., 2004).

Le fucoïdane extrait de *C. okamuranus* inhibe l'infection par le virus de la dengue et présente un IC₅₀ variant entre 4,7 et 500 µg/mL selon le sérotype. L'effet inhibiteur du fucoïdane est maximal contre le sérotype 2 et n'a pas d'effet sur le sérotype 1. De plus, l'arginine 323 semble être critique dans l'interaction de l'enveloppe virale du virus de la dengue avec le fucoïdane (Hidari et al., 2008). Par ailleurs, la carboxyréduction et la désulfatation diminuent l'activité antidengue démontrant l'importance des groupements sulfate et des acides glucuroniques dans l'inhibition de la dengue. L'utilisation de 10 µg/mL de fucoïdane permet de réduire de 80 % l'infection des cellules BHK-21 par le virus de la dengue de sérotype 2 comparativement à l'absence de polysaccharides sulfatés.

Le MIC₅₀ est atteint à concentration de 0,3 µg/mL de fucoïdane de *F. vesiculosus* pour le virus de la stomatite vésiculaire au niveau des cellules PRK, à une concentration de 7 µg/mL pour le virus de Sindbis au niveau des cellules VERO et à une concentration de 0,9 µg/mL pour le phlébovirus au niveau des cellules VERO (Baba et al., 1988 ; Crance et al., 1997). Cependant, le fucoïdane n'est actif contre le phlébovirus que durant la phase d'absorption du virus. Une concentration de 15 et 55 µg/mL de fucoïdane d'*U. pinnatifida* est nécessaire pour atteindre l'IC₅₀ pour le virus de l'influenza au niveau des cellules HeLa lorsqu'il est

respectivement mis en même temps que le virus ou après la mise en contact avec le virus (Lee et al., 2004). L'IC₅₀ est atteint à une concentration respective de 0,3 et 0,1 µg/mL de fucoïdane de *F. vesiculosus* pour les virus de Junin et de Tacaribe au niveau des cellules VERO. Cette concentration est nettement inférieure à la concentration présentant une toxicité au niveau des cellules VERO qui est de 200 µg/mL (Andrei et De Clercq, 1990).

Les virus de la diarrhée bovine virale et de la peste porcine sont responsables de pathologie animale causant de nombreuses pertes économiques. L'utilisation de fucoïdane permettrait de réduire l'incidence de ces deux maladies. L'analyse par cytométrie de flux a permis de constater que l'utilisation de 0,5 mg/mL de fucoïdane de *F. vesiculosus* réduit l'interaction entre les glycoprotéines E^{ms} du virus de la diarrhée bovine virale aux cellules CTe (Iqbal et al., 2000). De plus, une utilisation de 0,15 mg/mL de fucoïdane permet de réduire de 50 % l'infection des cellules par le virus (Iqbal et al., 2000). Enfin, le fucoïdane de *F. vesiculosus* diminue de 50 % l'infection des cellules VERO par le virus de la peste porcine à une concentration de 300 µg/mL, mais uniquement s'il est présent lors de la phase d'absorption du virus (Garcia-Villalon et Gil-Fernandez., 1991).

1.3.7. Activité antiparasitaire

La malaria est une parasitose causée principalement par le protozoaire *Plasmodium falciparum* et les fucoïdanes de *F. vesiculosus* et d'*U. pinnatifida* présentent une activité inhibitrice contre ce parasite. *In vitro*, le fucoïdane de *F. vesiculosus* est en mesure de se lier à la protéine circumsporozoïte (CS) des sporozoïtes de la malaria et donc d'inhiber leur attachement aux hépatocytes (figure 1). Une inhibition respective de 55 % et de 56 % de l'attachement des CS aux hépatocytes et de leur infection par les sporozoïtes a été observée lors de l'utilisation de fucoïdane. Le fucoïdane d'*U. pinnatifida* diminue aussi l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes avec un IC₅₀ de 1,95 à 9,17 µg/ml selon la fraction de fucoïdane utilisée (Chen et al., 2009). *In vivo*, l'injection intrapéritonéale respective de 1 mg/mL et de 100 mg/ml de fucoïdane chez les souris permet de réduire l'infection par les sporozoïtes à 17 % et de 37,12 % l'infection des souris par *P.berghei* (Pancake et al., 1992 ; Chen et al., 2009).

1.3.8. Effet sur les infections à prions

In vitro, le fucoïdane de *C. okamuranus* permet de diminuer la formation de PrP anormaux. *In vivo*, l'ingestion de fucoïdane permet de retarder l'apparition de la maladie à prion contractée de façon entérale chez des souris lorsqu'il est consommé pendant six jours suivants l'infection. Par conséquent, la période d'incubation passe de 231 jours à environ 360 jours. Par contre, l'ingestion de fucoïdane avant l'infection ne présente pas d'effet au niveau de la maladie. Cette différence d'action de la période d'ingestion au niveau de l'infection peut s'expliquer soit par une rapide élimination du fucoïdane du sang, ou par l'excrétion par le tube digestif du matériel infectieux lié au fucoïdane. De plus, aucune différence au niveau du temps d'incubation n'a été observée pour les différentes concentrations de fucoïdane utilisées (entre 2,5 % et 10 %). Cette observation peut être expliquée par le fait que la plus faible concentration utilisée dépasse la capacité d'absorption ou parce que la concentration sanguine de fucoïdane n'est pas reliée à la concentration ingérée (Doh-Ura et al. 2007).

1.3.9. Effet sur les toxines

Une injection de 25 mg/kg de fucoïdane de *Fucus vesiculosus* chez la souris permet de diminuer l'effet de 5 µg de la toxine A de *Clostridium difficile* au niveau intestinal. Le poids et le volume de sécrétion au niveau intestinal diminuent donc respectivement de 58,9 à 39,3 mg/cm et de 19,7 à 4,8 µL/cm avec l'utilisation du fucoïdane. De plus, la rupture des cellules de la muqueuse intestinale et la réaction inflammatoire est prévenue par l'utilisation du fucoïdane. La production de la myéloperoxydase et de l'adénosine désaminase est aussi diminuée par le fucoïdane, réduisant les effets négatifs de l'inflammation (Barreto et al., 2008).

L'envenimation par les crotales provoque un symptôme myotoxique à cause de l'action de la phospholipase A₂, entraînant la nécrose du muscle atteint. Le fucoïdane de *F. vesiculosus* permet une inhibition *in vitro* de l'effet de la myotoxine I, II, III et IV du serpent *Bothrops asper*, de la myotoxine I et II de *Cerrophidion godmani*, de la myotoxine I et II d'*Atropoides nummifer* et de la myotoxine I de *Bothriechis sclegelii*. En seulement cinq minutes, une inhibition totale de l'effet des toxines sur les cellules C2C12 est observée à la suite de la formation rapide d'un complexe entre le fucoïdane et la myotoxine. De plus, les trois peptides cytolitiques présents au niveau de la région 115 à 129 de la phospholipase sont complètement

inhibés par le fucoïdane. *In vivo*, l'injection locale de fucoïdane inhibe les dommages musculaires chez des souris causées pas les différentes phospholipases de *B. asper*, de *C. godmani*, d'*A. nummifer* et de *B. sclegelii*, de même que par le venin de *B. asper*. Cette inhibition varie entre 70 et 95 % selon les toxines. L'augmentation de la concentration de fucoïdane au dessus de 90 µg ne semble pas entraîner une meilleure protection contre les toxines des serpents (Angulo et al., 2003). Par ailleurs, le poids moléculaire du fucoïdane et le niveau d'injection semblent influencer son effet protecteur. C'est pourquoi l'injection de fucoïdane de faible poids moléculaire est inefficace dans la protection contre la nécrose chez des souris à la suite de l'injection de venin contrairement au fucoïdane de haut poids moléculaire. Par ailleurs, l'injection intraveineuse de fucoïdane de faible et de haut poids moléculaire est inefficace dans la protection contre la nécrose contrairement à l'injection au site d'envenimation (Azofeifa et al., 2008).

1.3.10. Protection gastrique

Les fucoïdanes de *C. okamuranus* et du *F. vesiculosus* sont en mesure de protéger la muqueuse gastrique et de favoriser la guérison d'ulcères gastriques par leurs effets inhibiteurs de la pepsine et par la stabilisation des facteurs de croissance des fibroblastes (bFGF) (Shibata et al., 2000). À cet égard, une inhibition par les fucoïdanes de l'hydrolyse de l'albumine sérique bovine (BSA) et de l'hémoglobine par la pepsine a été démontrée *in vitro*. Cette inhibition est supérieure à pH 4 qu'à pH 2, indiquant que la charge et la conformation des polysaccharides sulfatés est très importante dans leur liaison aux protéines de la muqueuse gastrique (Shibata et al., 2000). De plus, le degré de sulfatation et les sucres présents au niveau des ramifications des fucoïdanes vont influencer leurs effets antiulcéreux par leur impact au niveau de l'inflammation. Par exemple, les fucoïdanes extraits de *C. okamuranus* et de *F. vesiculosus* soit tout deux composés d'une chaîne principale de fucopyranosyl liée en ((1-3), mais n'ont pas le même impact au niveau de l'inflammation gastrique. Le fucoïdane de *C. okamuranus* ne stimule pas la formation de superoxydes par les macrophages et la sécrétion de facteurs nécrosants de tumeurs (TNF α) contrairement à celui de *F. vesiculosus* (Shibata et al., 2000). La stimulation de ces deux facteurs entraîne une augmentation de l'inflammation qui peut contribuer à la formation d'ulcères gastriques (Shibata et al., 2000). Le fucoïdane de *C. okamuranus* semble donc être un meilleur choix comme agent antiulcéreux pris sur une base régulière. *In vivo*, l'ingestion de fucoïdane de *C. okamuranus*

chez les rats a permis de prévenir les ulcères gastriques et de favoriser leur guérison (Nagaoka et al., 2000).

En plus de son rôle protecteur au niveau de la muqueuse gastrique, le fucoïdane est aussi en mesure de diminuer l'infection et les effets d'*Helicobacter pylori*. *In vitro*, une diminution de l'attachement d'*H. pylori* au niveau de la muqueuse gastrique porcine a été observée à la suite d'une utilisation variant entre 10 µg/mL à 1 mg/mL de fucoïdane extrait de *C. okamuranus* à pH 2 et 4. Une inhibition presque complète de l'attachement d'*H. pylori* est obtenue lors de l'utilisation de 1 mg/mL de fucoïdane. À pH 7, l'effet inhibiteur du fucoïdane diminue drastiquement à moins de 25 % lors de l'utilisation de 1 mg/mL de fucoïdane. Par ailleurs, un effet inhibiteur de l'attachement est aussi obtenu lors de l'utilisation de *F. vesiculosus*, mais uniquement à pH 2. *In vivo*, l'ingestion pendant trois jours d'eau contenant du fucoïdane de *C. okamuranus* permet de réduire l'infection par *H. pylori* chez les gerbilles. L'utilisation de 0,05 % et de 0,5 % de fucoïdane permet de réduire respectivement les infections par *H. pylori* de 60 % et à 80 %. L'utilisation de 0,05 % de fucoïdane permet de diminuer de 60 % les cas d'œdèmes et de 80 % les cas d'hémorragies, alors que l'utilisation de 0,5 % de fucoïdane permet de réduire respectivement de 90 % et de 100 % les cas d'œdèmes et d'hémorragies (Shibata et al., 2003). Par ailleurs, l'ingestion de 0,5 % de fucoïdane n'a pas entraîné d'œdèmes et d'hémorragies, ni de différences de poids corporel, d'alimentation ou d'hydratation chez les gerbilles servant de contrôle ce qui démontre l'innocuité du fucoïdane. Au niveau humain, l'administration orale de fucoïdane de *C. okamuranus* pendant trois mois a permis d'améliorer la condition et de diminuer le niveau d'infection par *H. pylori* de quatre patients sur six atteints d'ulcères gastriques. Par ailleurs, les symptômes des patients atteints de dyspepsie sans présence d'ulcères ont aussi diminué de 90 % à la suite de l'ingestion de 4,5 mg/kg par jour de fucoïdane. Aucun effet secondaire chez les patients n'a été observé par suite de l'ingestion de fucoïdane (Yamamoto et al., 2000).

1.3.11. Activité contraceptive

La liaison du spermatozoïde à l'ovule s'effectue par l'interaction ionique des résidus basiques de la proacrosine aux polysulfates présents sur la glycoprotéine ZP3 de la zone pellucide (Jones et Williams., 1990). Cette liaison est nécessaire pour la formation de l'acrosine qui exerce une activité enzymatique de type protéase permettant la digestion de la zone pellucide de l'ovule et le passage du spermatozoïde qui fertilisera l'ovocyte (Dravland et Mortimer,

1988 ; Moreno et *al.*, 1999). Le fucoïdane, par liaison à la proacrosine, est en mesure d'inhiber l'interaction de la proacrosine aux glycoprotéines de la zone pellucide et présente donc une activité contraceptive chez les mammifères (Huang et Yanagimachi., 1984 ; Shalgi et *al.*, 1986 ; Jones., 1991 ; Mahony et *al.*, 1991 ; Urch et Patel., 1991 ; Boettger-Tong et *al.*, 1992 ; Mahony et *al.*, 1993 ; Moreno et *al.*, 1999). Une propriété contraceptive a été démontrée *in vitro* chez le hamster, le rat, la souris, le cochon d'Inde, le porc, le bélier et l'humain (Huang et *al.*, 1982 ; Huang et Yanagimachi., 1984 ; Peterson et *al.*, 1984 ; Shalgi et *al.*, 1986 ; Dravland et Mortimer., 1988 ; Boldt et *al.*, 1989 ; Jones et Williams, 1990 ; Oehninger et *al.*, 1992 ; Moreno et *al.*, 2001). Une inhibition de 50 % de la liaison de la proacrosine à la zone pellucide d'ovule de porc et de bélier a été observée lors de l'utilisation respective de 0,35 μM et 19,1 nM de fucoïdane de *F. vesiculosus* (Williams et Jones., 1990 ; Jones., 1991). De surcroît, l'inhibition de la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide par le fucoïdane est dose-dépendante, variant de 32 à 100 % lors de l'utilisation respective de 0,02 à 0,1 mg/ml (Huang et Yamagimachi., 1984; Primakoff et *al.*, 1985 ; Oehninger et *al.*, 1992).

Certaines études ont démontré que la liaison du fucoïdane avec la proacrosine stimule son activation en acrosine, mais que la liaison subséquente au site actif de l'acrosine inhibe son effet protéolytique (Williams et Jones., 1990 ; Eberspaecher et *al.*, 1991 ; Lo Leggio et *al.*, 1994 ; Moreno et Barros., 2000 ; Moreno et *al.*, 2001). L'influence de la conversion de la proacrosine par le fucoïdane est dose-dépendante (Eberspaecher et *al.*, 1991). L'action protéolytique de l'acrosine de hamsters et de souris diminue à environ 20 % pour une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ de fucoïdane extrait de *F. vesiculos* (Moreno et *al.*, 2001). De la même façon, l'utilisation de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de fucoïdane diminue l'activité de l'acrosine de porc à 65 %.

Le fucoïdane n'a pas d'impact au niveau de la capacitation (Mahony et *al.*, 1991). Ainsi, une concentration variant en 0,5 et 10 mg/mL de fucoïdane ne présente pas d'effet au niveau de la motilité, de la vitesse, de la linéarité, de l'amplitude moyenne des déplacements latéraux de la tête du spermatozoïde et des battements de la flagelle (Mahony et *al.*, 1991 ; Oehninger et *al.*, 1992). Environ 80 à 90 % des spermatozoïdes de hamsters restent mobiles en présence de fucoïdane à une concentration de 1 mg/mL (Dravland et Mortimer., 1988).

Le poids moléculaire du fucoïdane, le degré de sulfatation, l'alignement des sulfate et leur orientation spatiale sont déterminants dans l'activité contraceptive, car ils permettront la liaison du fucoïdane aux résidus basiques présents au niveau de la structure tertiaire de la proacrosine (Jones et Williams., 1990 ; Jones., 1991). Cette combinaison de facteurs est essentielle à l'activité contraceptive. Par conséquent, bien que leurs densités de charges soient plus élevées que le fucoïdane, le sulfate de chondroïtine et l'acide hyaluronique ont une faible capacité contraceptive. Le même phénomène est observé pour le poids moléculaire parce que le dextrane de 500 K n'a pas d'activité contraceptive malgré son poids moléculaire important. De la même façon, la sulfatation à elle seule ne peut expliquer l'activité contraceptive parce que le glucose-6-sulphate et le glucosamine-2,3-disulphate ne présentent pas d'activités malgré la présence de sulfate (Huang et Yamagimachi., 1984 ; Jones., 1991). Cependant, l'absence de sulfate entraîne automatiquement une perte de l'activité contraceptive tel qu'observé pour le dextrane et le poly(vinylphosphate), contrairement au dextrane sulfate et au poly(vinylsulfate) qui présentent cette activité (Williams et Jones, 1990). La diminution du poids moléculaire et la désulfatation du fucoïdane résultent en une diminution de la liaison du fucoïdane à la proacrosine (Urch et Patel., 1991). Enfin, l'activité contraceptive semble être indépendante de la composition de la chaîne du polysaccharide (Williams et Jones, 1990).

1.3.12. Potentiel thérapeutique lors des chirurgies et des brûlures

La proangiogenèse consiste en la stimulation de l'angiogenèse, qui est un processus complexe permettant le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, dans le but de revasculariser les tissus ayant subi une ischémie à la suite d'une thrombose. La migration, la prolifération et la différenciation de cellules souches conduisant à l'élaboration de nouveaux vaisseaux sanguins sont régulées par une balance d'inducteurs et d'inhibiteurs intra et extracellulaires. Les principaux inducteurs sont les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), les angiopoïétines, Tie-1, Tie-2, les métalloprotéinases, les intégrines et les activateurs du plasminogène. Le fucoïdane est en mesure d'induire l'angiogenèse *in vitro* par modulation des inducteurs qui vont influencer la mobilisation des cellules souches et leur incorporation dans les tissus (Boisson-Vidal et al., 2007). L'utilisation de fucoïdane peut être bénéfique pour les patients ayant subi un accident ischémique, car il favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins permettant de prévenir la nécrose dans les tissus atteints (Boisson-Vidal et al.,

2007). Une concentration de 10 µg/mL de fucoïdane stimule *in vitro* la pro-angiogenèse au niveau des cellules endothéliales en présence de FGF-2 (Matou et al., 2002 ; Zemani et al., 2005). De plus, l'interaction du FGF-2 au complexe fucoïdane/chitosane permet de contrôler sa libération et de prolonger sa durée de vie en le protégeant contre l'inactivation par la chaleur ou la protéolyse (Nakamura et al., 2007). L'utilisation de fucoïdane de faible poids moléculaire permet aussi d'augmenter la liaison de VEGF₁₆₅ au récepteur VEGFR-2 et à la neuropiline (NRP1) des cellules endothéliales (Lake et al., 2006). *In vivo*, l'injection du complexe fucoïdane/chitosane contenant le FGF-2 permet de stimuler la néovascularisation au site d'injection chez des souris (Nakamura et al., 2007). De la même façon, l'injection de 5 mg/kg/jour de fucoïdane avec 1 µg/kg/jour de FGF-2 permet, après 14 jours, de ramener la circulation sanguine à un niveau relativement normal au niveau du muscle de rat ayant subi une ischémie, soit de 90,5 % comparativement à 42 % pour le contrôle sans fucoïdane (Luyt et al., 2003). La densité capillaire est aussi augmentée, passant de 9,6 capillaires/muscles à 19,1 capillaires/muscles avec l'utilisation de fucoïdane/FGF-2 (Luyt et al., 2003). De plus, le fucoïdane stimule aussi la mobilisation de SDF-1 chez des souris et des singes (Sweeney et al., 2002). L'activité proangiogénique du fucoïdane est reliée à la taille de la molécule, à sa charge, à la composition de la chaîne de sucre, à son contenu en sulfate et leur localisation sur la chaîne (Zemani et al., 2005 ; Boisson-Vidal et al., 2007). Des fucoïdanes de faible poids moléculaire extrait d'*A. nodosum* stimulent l'expression de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ et du cluster de différenciation PECAM-1 lorsqu'ils sont pris conjointement avec du FGF-2. La formation de tube vasculaire, la prolifération des cellules endothéliales et leur adhésion sont favorisées par le fucoïdane. L'expression de $\alpha_v\beta_3$, quant-à-elle, est inhibée par le fucoïdane (Matou et al., 2002 ; Chabut et al., 2003 ; Boisson-Vidal et al., 2007). Un fucoïdane de 15 à 20 kDa stimule la migration de HUVEC contrairement au fucoïdane natif qui présente un effet antitumoral grâce à son inhibition de l'angiogenèse (Matsubara et al., 2005). De plus, une séquence d'au moins quatre monosaccharides est nécessaire pour l'activité pro-angiogenèse (Boisson-Vidal et al., 2007). De surcroît, la désulfatation du fucoïdane inhibe son activité pro-angiogenèse *in vitro* et la mobilisation des cellules souches *in vivo*. Cependant, les groupements sulfates ne peuvent expliquer à eux seul l'activité du fucoïdane (Boisson-Vidal et al., 2007).

Le développement de sténose par suite d'une transplantation est la principale cause d'échec de transplantation cardiaque. Ce phénomène est causé par la prolifération de cellules telles que les cellules musculaires lisses (SMC) et les cellules inflammatoires, puis à leur accumulation

dans le lumen de l'artère. Cette prolifération peut être stimulée comme suite au développement de la réponse immunitaire par la libération de facteurs pro-inflammatoires tels que les cytokines, les chémokines et les clusters de différenciation 68 (CD68), ainsi que par l'activation de la voie de la MAPK. *In vitro*, l'utilisation de 10 µg/mL de fucoïdane permet de réduire de 60 % la prolifération des SMC (McCaffrey et al., 1992). De plus, une différence de l'IC₅₀ est obtenue lors de l'utilisation de fucoïdane fractionné et de fucoïdane de faible poids moléculaire, soit de 0,07 µmol/l pour le fractionné comparativement à 4 µmol/l pour le faible poids moléculaire (Deux et al., 2009). *In vivo*, l'injection intramusculaire de 5 mg/kg/jour de fucoïdane de faible poids moléculaire chez les rats permet de prévenir les lésions coronaires à la suite d'une greffe cardiaque grâce à une diminution de la réponse immunitaire (Alkhatib et al., 2006). De plus, une inhibition de 60 % de l'hyperplasie et une augmentation de 25 % de l'aire du lumen ont aussi été observées chez les lapins à la suite d'une injection intramusculaire de fucoïdane grâce à son effet antiprolifératif des SMC et à son inhibition de la libération de facteurs pro-inflammatoires (Deux et al., 2007). Le fucoïdane réduit la prolifération des SMC par l'inhibition de l'activation de la MAPK et prévient la translocation nucléaire de la MAPK phosphorylée. L'activité antiproliférative du fucoïdane est fonction du degré de sulfatation et de la longueur de la chaîne. Une désulfatation entraîne donc une diminution de l'activité et un degré de polymérisation de trente sucres est nécessaire pour maintenir l'activité du fucoïdane (Religa et al., 2000).

Le fucoïdane présente aussi un effet inhibiteur variant entre 96,3 % et 99,8 % au niveau de la formation d'ostéoclastes comparativement au contrôle sans fucoïdane. Cet effet inhibiteur du fucoïdane pourrait être bénéfique dans des pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde ou l'ostéoporose où la résorption du tissu osseux par les ostéoclastes se produit plus rapidement que la formation osseuse par les ostéoblastes (Kariya et al., 2004).

L'utilisation d'un hydrogel à base de chitosane et de fucoïdane permet une guérison plus rapide et plus efficace des brûlures chez des lapins. L'utilisation de ces deux composés permet une régénération et une ré-épithélisation de la peau grâce à leurs effets antiinflammatoire, antibactérien, stimulateur des fibroblastes et des cellules épithéliales de même que l'augmentation de la sécrétion de TGF-β1. Aucune présence d'œdème et d'hémorragie n'a été observée chez lors de l'utilisation de gels à base de chitosane, de fucoïdane ou des deux comparativement au contrôle n'ayant reçu aucun hydrogel. De plus, une guérison plus

importante est observée après 21 jours lors de l'utilisation d'un gel de fucoïdane-chitosane. Enfin, le fucoïdane et le chitosane présentent un effet synergique au niveau de la guérison de blessures (Sezer et al., 2008).

1.3.13. Modification du métabolisme des lipides

L'obésité et les problèmes qui en découlent sont étroitement reliés à la différenciation des adipocytes et à l'accumulation subséquente de gras dans l'organisme. Plusieurs protéines contrôlent l'adipogenèse et la lipogenèse tel que le récepteur au facteur activé de prolifération des peroxyosomes (PPAR), l'acétyl coenzyme-A carboxylase (ACC) et la protéine de liaison des acides gras (aP2). Le PPAR est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires qui agit comme facteur de transcription des gènes cibles régissant le métabolisme et la différenciation des adipocytes. Sa surexpression stimule l'adipogenèse et la lipogenèse *in vitro*. L'ACC est une enzyme qui catalyse la carboxylase irréversible de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. La production de la malonyl-CoA entraîne la biosynthèse de la chaîne d'acides gras. L'aP2 est un marqueur de la différenciation terminale des adipocytes et est aussi impliqué dans le transport des acides gras à travers les membranes. L'utilisation de 100 et 200 µg/mL de fucoïdane diminuent respectivement l'adipogenèse des préadipocytes 3T3-L1 de 32,8 % et de 39,7 %. De plus, les mêmes concentrations de fucoïdane réduisent respectivement de 6,2 % et 27,2 % l'expression du gène aP2, de 22,2 % et 28,2 % le gène ACC et de 44,2 % et 69,4 % le gène PPAR γ . Le fucoïdane semble donc être en mesure de diminuer l'accumulation de graisse par son impact au niveau de l'expression des gènes aP2, ACC et PPAR((Kim et al., 2008).

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme qui hydrolyse les lipides en lipoprotéines et les lipoprotéines en acides gras et en glycérol. Cette enzyme nécessite l'apolipoprotéine C-II (ApoC-II) comme cofacteur. Une déficience en LPL entraîne une hypertriglycémie, ce qui favorise les dépôts d'athérome dans les vaisseaux artériels et coronariens et donc le risque de maladie cardio-vasculaire. Le fucoïdane stimule la transcription et la sécrétion de LPL de façon dose et temps dépendants, avec un niveau maximal atteint lors de l'utilisation de 50 µg/mL de fucoïdane. L'expression du LPL mRNA est stimulée respectivement de 20 à 25 % et de 35 % lors de la mise en contact avec le fucoïdane pendant 24 à 28 heures et 72 heures. De plus, le fucoïdane stabilise la LPL lorsqu'elle est présente dans le sang. La sécrétion de

l'ApoC-II par les adipocytes est aussi stimulée par l'utilisation de fucoïdane de façon dose et temps-dépendant, avec un niveau maximal atteint lors de l'utilisation de 100 µg/mL de fucoïdane. Cependant, aucun impact sur sa transcription n'a été observé (Yokota et al., 2009). Par ailleurs, *in vivo* l'injection intraveineuse de fucoïdane de *P. wrightii* stimule la sécrétion de LPL (Rozkin et al. 1991) Par conséquent, le fucoïdane est en mesure de modifier le métabolisme des lipides par son impact au niveau de la sécrétion de la LPL et de l'ApoC-II et pourrait donc prévenir certaines maladies cardio-vasculaires. Le fucoïdane de *L. japonica* diminue de façon considérable la quantité de cholestérol, de triglycérides et de lipoprotéines de basse densité (LDL-C) et augmente la quantité de lipoprotéines de haute densité (HDL-C) chez des souris souffrant d'hypercholestérolémie et de rats souffrant d'hyperlipidémie (Li et al., 1999 ; Li et al., 2001). De la même façon, une diminution du cholestérol et des triglycérides a été observée à la suite de la prise de fucoïdane chez des patients souffrants d'hyperlipidémie (Li et al., 2008)

1.3.14. Diminution des hépatopathies

Au niveau mondial, plus de 100 millions de personnes sont atteintes d'une fibrose hépatique pouvant être causée entre autres par l'hépatite B ou C, l'abus d'alcool ou par une stéatohépatite non alcoolique. En biologie clinique, les maladies du foie peuvent être détectées par le niveau élevé des activités de l'alanine amino transférase (ALT) et de l'aspartate amino transférase (ATF). Les hépatopathies peuvent être diminuées par la consommation d'algues brunes, et plus spécifiquement par le fucoïdane grâce à sa liaison avec les ROS et son interaction avec le facteur-(qui est un facteur stimulateur de la fibrose hépatique (Hayashi et al., 2008). Les niveaux d'ALT et d'ATF chez les souris ayant reçu le composé hépatotoxique D-galactosamine (D-gal) sont significativement inférieurs lorsque celles-ci ont été nourries pendant sept jours avec les algues *Laminaria* sp., *Gelidium* sp., *Sargassum fulvellum* ou *Eisenia bicyclis* comparativement à celles n'ayant reçu que la D-gal. De plus, le fucoïdane est le seul polysaccharide présent dans ces algues qui diminue l'activité de l'AST et de l'ALT chez ces souris (Kawado et al., 2007). De la même façon, l'injection intraveineuse de 50 mg/kg de fucoïdane chez les rats permet de réduire respectivement les marqueurs de dommages hépatiques AST et ALT à des niveaux normaux, soit de 77 et 67 karumen unité/mL, comparativement à 707 et 752 karumen unité/mL lors de la stimulation d'hépatopathie aiguë par le CCl₄ sans la prise de fucoïdane. Une inhibition des niveaux d'AST et d'ALT a aussi été observée lors d'une hépatite chronique chez les rats, passant

respectivement de 433 et 568 karumen unité/mL sans la prise de fucoïdane à 265 et 238 karumen unité/mL avec la prise de fucoïdane. De plus, la surface de fibrose au niveau du foie diminue de 14,8 % à 4,3 % lors de la prise de fucoïdane. Par ailleurs, le fucoïdane diminue la mort des hépatocytes. L'injection de 1 mg/mL de fucoïdane permet de prévenir complètement la mort cellulaire causée par l'injection de CCl₄. Une diminution de l'activation des cellules d'Ito a été observée à la suite de la prise de 1mg/ml de fucoïdane.

1.3.15. Diminution des uropathies

L'hyperoxalurie est une pathologie du rein causée par un déficit enzymatique résultant en la transformation de la glyoxylate en oxalate, puis en son accumulation sous sa forme calcique insoluble qui cause des lithiases au niveau du rein et des néphrocalcinose. De plus, l'accumulation d'oxalate provoque des dysfonctions au niveau des mitochondries, conduisant à la formation de ROS, causant de la peroxydation et qui endommageant les reins. L'augmentation des activités de la phosphatase alcaline (ALP) dans l'urine, de la γ -glutamyl transférase (γ -GT), de la β -glucuronidase (β -Glu) et de la N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) sont des indicateurs de dommages rénaux causés par une hyperoxalurie. L'injection sous-cutanée de fucoïdane de *F. vesiculosus* lors de la création d'un état d'hyperoxalurie chez des rats permet de diminuer la quantité de ROS produite, d'inhiber la peroxydation des lipides par les ROS et le gonflement mitochondrial. Les activités des enzymes antioxydantes et le niveau de glutathione sont augmentés par le fucoïdane. Les activités mitochondriales lors du cycle de Krebs sont normalisées par le fucoïdane (Veena et al., 2008). De plus, comparativement aux rats souffrant d'hyperoxalurie non traités, l'injection de fucoïdane permet de diminuer le poids du rein, d'augmenter le volume urinaire, de diminuer l'excrétion de protéines résultant des dommages au rein et de rehausser le pH à un niveau relativement normal ce qui diminue la formation de calculs rénaux. Les constituants urinaires sont aussi influencés par l'injection de fucoïdane. Le fucoïdane permet de diminuer la quantité d'oxalate, de calcium, de phosphore et d'acide urique et d'augmenter la quantité de citrate, de magnésium et de GAG comparativement aux rats malades non traités (Veena et al., 2006). Une diminution de l'activité des enzymes ALP, γ -GT, β -Glu et NAG a été obtenue à la suite de la prise de fucoïdane par les rats (Veena et al., 2006). Par conséquent, le fucoïdane est capable de prévenir de façon efficace les dommages au rein causés par un état d'hyperoxalurie.

La néphrite d'Heymann est une maladie auto-immune qui peut être induite chez le rat pour servir de modèle à la glomérulonéphrite au niveau humain. Cette maladie est souvent responsable de protéinurie. L'ingestion de fucoïdane de *L. japonica* présente des effets protecteurs au niveau du rein chez les rats souffrant de la néphrite d'Heymann et pourrait donc être un agent thérapeutique dans le traitement de néphrite. En effet, les niveaux élevés d'excrétion protéique et de créatine plasmatique sont diminués par l'ingestion de fucoïdane à des doses variant entre 100 et 200 mg/kg chez les rats (Zhang et al., 2005)

L'insuffisance rénale chronique est un terme désignant toutes les maladies conduisant irrémédiablement à une insuffisance rénale chronique dans un délai variable et qui peut résulter d'une lésion inflammatoire. L'utilisation de 200 mg/kg de fucoïdane de *Laminaria japonica* est en mesure de diminuer l'insuffisance rénale par son effet stimulateur du flux sanguin au niveau rénal et par son effet inhibiteur au niveau de l'adhésion des sélectines aux leucocytes qui contribuent à l'inflammation et aux dommages tissulaires au niveau du rein (Zhang et al., 2003).

1.3.16. Effet sur la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative du tissu cérébral qui entraîne une perte progressive et irréversible des fonctions mentales telles que la perte de la mémoire, de jugement, de raisonnement, des sautes d'humeur et des changements de comportements. La présence d'agrégat de bêta-amyloïde est un signe caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Ce peptide de 39 à 43 acides aminés dérive de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et démontre des effets neurotoxiques au niveau des neurones et des cellules gliales. Le fucoïdane est en mesure d'atténuer l'effet neurotoxique de la bêta-amyloïde. Une augmentation de la survie neuronale a été observée lors d'un prétraitement des cellules pro-encéphales de rats avec une concentration de fucoïdane de 0,1 et 1 μ M. De plus, le fucoïdane est aussi en mesure d'inhiber l'action de la bêta-amyloïde au niveau de la formation de ROS, de la diminution de la phosphorylation de la protéine kinase C (PKC) ainsi que de l'activation des capsasses 3 et 9 qui provoquent l'apoptose des cellules neuronales. Par contre, aucune diminution de l'agrégation des bêta-amyloïde n'a été observée à la suite de l'utilisation de fucoïdane (Jhamandas et al., 2005).

1.3.17. Effet inhibiteur du vieillissement de la peau par les UV

Les rayons UVB réduisent le procollagène de type 1 et stimulent la synthèse de métalloprotéinases matricielles 1 (MMP-1), jouant un rôle majeur dans le vieillissement de la peau. En effet, la synthèse de MMP-1 par les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules inflammatoires suite à l'exposition aux rayons UV contribue à désordonner la structure matricielle de la peau par un clivage des fibres de collagène et favorise le vieillissement prématuré. Le fucoïdane a démontré un effet inhibiteur au niveau la transcription du gène codant pour la MMP-1 et son expression. L'utilisation *in vitro* de 10 µg/mL de fucoïdane a permis une réduction significative de l'expression de la protéine MMP-1. De la même façon, une concentration respective de 1, 10 ou 100 µg/mL de fucoïdane a inhibé la MMP-1 mRNA de 70,7 %, 77,2 % et 81,6 % comparativement à l'exposition aux UV sans fucoïdane. Une inhibition respective du promoteur de MMP-1 de 8,5 %, 45,7 % et 57,8 % est obtenue lors de l'utilisation de 1, 10 et 100 µg/mL. Une prévention de la réduction de la synthèse de procollagène a aussi été constatée à la suite de l'utilisation de fucoïdane. L'expression de la protéine du procollagène 1 est augmentée de 1,51 fois avec l'utilisation de 1 µg/mL, de 2,08 fois avec 10 µg/mL et de 2,26 fois avec 100 µg/mL de fucoïdane. L'ARNm du procollagène 1 est aussi stimulé de façon dose dépendante lors de l'utilisation de fucoïdane (Moon et *al.*, 2009).

1.3.18. Absorption au niveau humain

L'ingestion orale par des humains pendant 12 jours de 3 grammes / jours d'algue d'*U. pinnatifida* contenant 10 % de fucoïdane de haut poids moléculaire ou de fucoïdane purifié à 75 % permet d'obtenir une concentration respective de 4 002 et 12 989 mg/mL de fucoïdane intact au niveau du plasma sanguin (Irhimeh et *al.*, 2005).

1.3.19. Stimulation du système immunitaire chez les plantes

Le fucoïdane stimule la protection des plantes contre le virus de la mosaïque du tabac (TMV) par l'activation de protéines de défense des plantes, telles que la phenylalanine-ammonia lyase (PAL), la lipoxygénase (LOX) et la glutathione-S-transférase (GST). De plus, le

fucoïdane permet aussi l'alcalinisation du milieu extracellulaire, la libération de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'accumulation de signaux de défense tels que l'acide salicylique et la phytoalexine scopolétine contribuant à la défense des plantes (Klarzynski et al. 2003 ; Chandia et Matsushiro., 2008). Lors de l'étude de Chandia et Matsushiro (2008), la vaporisation une fois par semaine pendant un mois d'une solution de 500 µg/ml de fucoïdane extrait de *L. vadosa* sur les feuilles du plant de tabac a stimulé l'activité de ces enzymes, passant de 0,87 à 1,84 nmol/min par mg de protéines pour la PAL, de 12,58 à 21,45 µmol/min par mg de protéines pour la LOX et de 0,05 à 0,18 µmol/min par mg de protéines pour la GST.

1.3.20. Innocuité

L'innocuité des fucoïdanes de *Cladosiphon okamuranus* a été testée à la suite de l'administration orale chez des rats. Aucun changement n'a été observé suite à la prise de 600 mg de fucoïdanes par kg de poids corporel par jour. Aucun animal n'est mort suite à l'ingestion de fucoïdane, la qualité et la quantité des fèces et des poils sont les mêmes, la quantité de nourriture ingérée est semblable, le poids corporel et les organes sont semblables au groupe contrôle. Au-delà de 1 200 mg/kg/jour, une augmentation du temps de coagulation sanguine a été observée (Gideon et Rengasamy, 2008). Pour ce qui est de la toxicité de *Laminaria japonica*, aucun effet indésirable n'est observé chez les rats en dessous d'une ingestion de 300 mg/kg corporel par jour. Par contre, au dessus de 900 mg/kg corporel/jour, le temps de coagulation augmente (Li et al., 2005). Le fucoïdane extrait des sporophylles d'*Undaria pinnatifida* ne présente pas d'effets toxicologiques chez les rats à la suite de sa consommation pendant 4 semaines. Une ingestion orale de 1350 mg de fucoïdane par kg corporel par jour n'induit aucune différence significative par rapport au poids corporel, aux analyses ophtalmologique, urinaire, hépatologique et histopathologique. Par ailleurs, aucun changement dans la coagulation sanguine n'a été observé (Kim et al., 2010).

Tableau 5- Synthèse du sens des activités biologiques selon le poids moléculaire

| Activité | Sens de l'activité selon le poids moléculaire (PM) | Référence |
|---|---|-------------------------------------|
| Antivirale | Augmente avec le PM (valeur maximale entre 10 à 100 KDa) | Damonte et al., 2004 |
| Anticoagulante | Augmente avec le PM | Soeda et al., 1993 |
| Activité contraceptive | Augmente avec le PM | Urch et Patel., 1991 |
| Inhibition de l'adhésion des cellules tumorales | Augmente avec le PM | Liu et al., 2005 |
| Effet sur les toxines | Augmente avec le PM si le fucoïdane est injecté au site d'envenimation | Azofeifa et al., 2008 |
| Anticomplément | Augmente avec le PM (plateau atteint à un PM de 46800 Da pour la voie classique) (plateau atteint à un PM de 13500 Da pour la voie alternative) | Blondin et al., 1996 |
| Mobilité et diffusion du fucoïdane jusqu'au tissu | Diminue avec le PM | Yang et al., 2008 |
| Activité proangiogénique | Diminue avec le PM | Matsubara et al., 2005 |
| Antitumorale | Diminue avec le PM | Yang et al., 2008 |
| Antioxydante | Diminue avec le PM | Ye et al., 2005 ; Choi et al., 2009 |

1.4 Problématique et Hypothèse

1.4.1 Problématique

La compagnie Innovactiv., anciennement Les Biotechnologies Océanova inc., a pour mission d'identifier, développer, fabriquer et commercialiser des ingrédients actifs pour les secteurs à haute valeur ajoutée que sont la nutraceutique et la cosméceutique. Au Canada, les ressources marines que l'on retrouve dans les eaux froides baignant les régions maritimes du Québec représentent un fort potentiel de développement. La commercialisation des algues du St-Laurent nécessite la connaissance préalable de la disponibilité de la ressource, la concentration, la composition et l'activité biologique des biomolécules présentes dans ces algues. Tel que démontré dans la revue de littérature, le fucoïdane possède de nombreuses activités biologiques. Plusieurs études ont démontré une activité accrue pour des poids moléculaires des fucoïdanes permettrait d'élargir le spectre d'activité biologique et faciliterait la caractérisation structurale difficilement réalisable sur des polymères de poids moléculaires aussi élevés que les fucoïdanes. Les approches chimiques modifient la composition et la structure des fucoïdanes. L'hydrolyse enzymatique est une approche efficace et rapide qui permettrait de caractériser les fucoïdanes présents dans les algues du St-Laurent, pour produire des fractions plus actives de ces polysaccharides sans en modifier la composition chimique nécessaire à plusieurs activités biologiques, et donc de valoriser les ressources locales du Québec. Cependant, l'accès aux enzymes spécifiques à la structure unique de chaque fucoïdane est limité et aucune enzyme n'est disponible commercialement. L'isolement de bactéries productrices d'enzymes capables d'hydrolyser les fucoïdanes permettra d'obtenir une source d'enzymes renouvelable.

1.4.2 Hypothèse

Des bactéries d'origine marine du fleuve St-Laurent possèdent des enzymes capables d'hydrolyser des polysaccharides tels que les fucoïdanes.

1.5 Objectifs

1.5.1 Objectif général

Isoler et caractériser de nouvelles bactéries présentes dans le fleuve St-Laurent possédant des enzymes capables d'hydrolyser des polysaccharides tels que les fucoïdanes.

1.5.2 Objectifs spécifiques

- a. Isoler et identifier des bactéries fucoïdase positives par des préenrichissements à partir d'échantillons d'algues et d'eau de mer prélevés dans le fleuve St-Laurent (Ste-Luce, mai 2007) et sélectionnées par une réaction chromogénique.
- b. Déterminer l'efficacité de différents milieux de préenrichissement à base d'eau de mer (*Marine Broth*) avec ou sans les différents sucres composant le fucoïdane (glucose, fucose ou galactose) pour la production d'enzymes bactériennes capables d'hydrolyser le fucoïdane.
- c. Caractériser les cinétiques enzymatiques de la fucosidase et de la fucoïdane hydrolase.

Chapitre 2

Isolement de bactéries productrices d'enzymes capables d'hydrolyser le fucoïdane et utilisation du fucoïdane et de ses constituants

2.1 Résumé

Les fucoïdanes des algues brunes représentent un potentiel de développement important pour l'industrie marine à cause de leurs activités biologiques. Ces activités sont amplifiées par l'hydrolyse des structures complexes. Cependant, peu d'enzymes bactériennes ont été découvertes et aucune n'est disponible commercialement. La présente étude a permis l'isolement de bactéries fucosidases positives à partir des préenrichissements inoculés d'échantillons d'eau de mer prélevés dans le fleuve St-Laurent (Ste-Luce, mai 2007). Ces bactéries productrices d'enzymes capables d'hydrolyser le fucoïdane ont été sélectionnées grâce à une réaction chromogénique. Le séquençage d'une section de la petite sous-unité du gène d'ADNr 16S de ces bactéries a permis de déterminer qu'il s'agissait de *Pseudoalteromonas* spp. Des fermentations ont été effectuées afin de vérifier la cinétique de croissance sur un milieu à base d'eau de mer (*Marine Broth*) avec ou sans les différents sucres composant le fucoïdane (glucose, galactose et fucose). Les mesures de densité optique, de comptes viables et les taux de croissance sont similaires pour les différents sucres. Par conséquent, l'hydrolyse du fucoïdane et son utilisation par la bactérie n'ont pu être démontrées par les fermentations.

2.2 Introduction

Les communautés microbiennes, incluant celles résidant à la surface des macroalgues et dans l'eau de mer, participent au recyclage de la matière organique dans l'environnement marin (Ivanova et al., 2003). À cet égard, les microorganismes sont en mesure d'hydrolyser une variété de polysaccharides présents dans la paroi des algues.

Plusieurs polysaccharides présents dans les algues présentent des propriétés thérapeutiques. Notamment, le fucoïdane présent dans la paroi des algues brunes présente des propriétés biologiques, telles que des activités anticoagulantes, antithrombotiques, antiinflammatoires, antivirales, antitumorales et contraceptives, qui sont parfois amplifiées par son hydrolyse en oligosaccharides (Berteau et Mulloy, 2003). Cette hydrolyse peut être effectuée chimiquement ou de façon enzymatique. Cependant, l'hydrolyse biologique est une méthode rapide et efficace qui ne modifie pas la structure native du polysaccharide contrairement à la méthode chimique (Berteau et Mulloy, 2003).

Les effets médicaux des sucres complexes représentent un potentiel de valorisation des algues du St-Laurent (Holtkamp et al., 2009). Cependant, peu d'études ont été faites au niveau de ces algues et de l'hydrolyse de leurs fucoïdanes par les enzymes bactériennes présentes chez les espèces du St-Laurent (Rioux et al, 2007). Le but de cette étude est donc d'utiliser des techniques de microbiologie et de biologie moléculaire pour isoler et caractériser une bactérie produisant des enzymes capables d'hydrolyser les fucoïdanes, permettant ainsi d'élucider leur structure et de produire des oligosaccharides actifs.

2.3 Matériel et méthodes

2.3.1 Population à l'étude

Les bactéries d'origine marine étudiées proviennent d'échantillons d'algues laminaires et d'eau de mer prélevés dans le fleuve St-Laurent à la hauteur de Ste-Luce sur mer en mai 2007.

2.3.2 Isolement de bactéries productrices d'enzymes hydrolysant le fucoïdane

Différents milieux de préenrichissement ont été testés pour favoriser la croissance de bactéries productrices d'enzymes capables d'hydrolyser le fucoïdane (tableau 6). Ces préenrichissements sont basés sur les protocoles modifiés de Sakai et collaborateurs (2004) et d'Alexeva et collaborateurs (2002). La température de croissance utilisée lors de l'étude est de 20 °C. Des tubes de 10 mL de culture ont été inoculés avec de l'eau de mer ou de l'eau de lavage de l'algue à raison d'une inoculation 1 : 10. Les bactéries ont ensuite été isolées sur des Pétri composés de « Plate count agar (PCA) » (BD, Etats-Unis) contenant de l'eau de mer et testés pour la présence de fucosidases grâce au substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha-L-fucopyranoside (Biosynth chemistry & biology, Suisse) (figure 6). Les bactéries fucosidases positives ont été utilisées pour le reste de l'étude.

Tableau 6 Préenrichissements utilisés pour favoriser la croissance de bactéries capable d'hydrolyser le fucoïdane

| Milieu | Sucre (0,5 %) | | Polypeptone | | | Extrait de levure | | Chlorure d'ammonium |
|--------|--------------------------------|----------|-------------|-------|--------|-------------------|---------|---------------------|
| | Fucoïdane, galactose ou fucose | D-xylose | 0,25 % | 0,1 % | 0,01 % | 0,01 % | 0,002 % | 0,01 % |
| A | √ | | | | | | | |
| B | √ | | | | | | | √ |
| C | √ | | | | | √ | | |
| D | √ | | | √ | | | | |
| E | √ | | | | √ | | √ | |
| F | √ | √ | √ | | | | | |

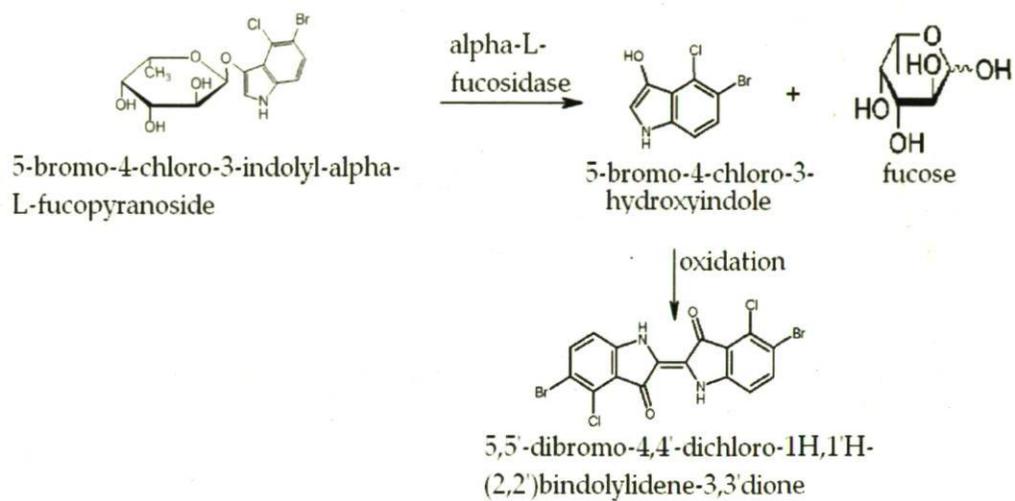


Figure 6- Réaction chromogénique

2.3.3 Identification de la bactérie productrice d'enzymes hydrolysant le fucoïdane

L'ADN génomique des bactéries fucosidases positives a été extrait en suivant le protocole d'Éric Rasolofo (Annexe 1).

Une sous-unité de l'ADNr 16S a ensuite été amplifiée à partir de l'ADN génomique. L'ADNr 16S est un gène codant pour la formation des ribosomes chez les procaryotes. Ce gène est retrouvé chez toutes les bactéries et varie très peu dans l'évolution. Des régions conservées permettent l'utilisation d'amorces universelles nécessaires lors de l'amplification en chaîne de la région d'intérêt. De plus, des domaines variables sont présents entre les régions conservées, ce qui permet de différencier les différentes espèces microbiennes (Head et *al.*, 1998 ; Riesenfeld et *al.*, 2004).

La réaction d'amplification en chaîne a été effectuée avec l'utilisation des amorces universelles de procaryote 27F dégréérée (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 788R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAA-3') suivant le protocole déjà établi par le laboratoire pour l'appareil GenAmp de chez Perkin Elmer (Annexe 2). Un contrôle négatif a été fait pour s'assurer qu'il n'y a pas eu présence de contamination dans nos réactifs. Les produits de l'amplification ont ensuite été purifiés par la trousse «QIAquick PCR Purification» (Qiagen, Etats-Unis) en utilisant une microcentrifugeuse et en suivant les recommandations du fournisseur (Annexe 3).

La réaction de séquençage subséquente a été faite avec les amorces 27F et 788R à l'aide de la trousse «BigDye Terminator sequencing» (Applied Biosystems, Etats-Unis) suivant le protocole recommandé par le fournisseur (annexe 4). Pour pouvoir produire des fragments pouvant être lus en entier sur les deux brins, les amorces choisies lors de la réaction de séquençage doivent produire des fragments d'environ 800 paires de bases et moins, car c'est la résolution maximale du séquenceur.

Les produits de séquençage ont ensuite été purifiés à l'éthanol suivant le protocole ABI pour éliminer les résidus PCR (Annexe 5), puis resuspendus dans 10 µl de formamide, et enfin dénaturés à 95 °C pendant trois minutes. Les produits sont placés immédiatement sur glace puis transférés sur une plaque de séquenceur pour être séquencés par le séquenceur ABI 3100 (États-Unis). L'assemblage des séquences a été effectué à l'aide du logiciel BioEdit, puis une

identification phylogénétique des clones a été effectuée par un Blast contre la banque de données de NCBI.

2.3.4 Standardisation de l'inoculum

Une standardisation de l'inoculum bactérien d'une des souches isolées a été effectuée avant chaque croissance microbienne sur les différents milieux. Un tube de 10 mL de milieu de culture *Marine Broth* a été ensemencé à partir d'un échantillon cryogénique congelé puis incubé pendant deux heures à 20 °C avec une agitation de 200 rpm. Un deuxième repiquage à 1 % a été effectué et incubé pendant douze heures suivi d'un troisième repiquage incubé aussi pendant douze heures. Des mesures de densité optique à 650 nm et des ensemencements sur boîte de Pétri contenant du PCA avec de l'eau de mer ont été effectuées au début et à la fin de chaque repiquage. Cette expérience a été répétée trois fois.

2.3.5 Fermentations

La croissance de la bactérie fucosidase positive isolée à partir de préenrichissements a été testée sur les différents sucres composant le fucoïdane. La croissance a été effectuée dans un milieu à base d'eau de mer composé de 0,5 % de peptone, 0,1 % d'extrait de levure (BD, États-Unis) avec ou sans 0,5 % de sucre. Les sucres ajoutés individuellement sont le L-fucose (Sigma-Aldrich, États-Unis), le D-galactose (Difco, France), le D-glucose (EMD chemicals, États-Unis) et le fucoïdane de *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich, États-Unis). La croissance de *Pseudoalteromonas* sp. dans le milieu sans sucre a servi de témoin négatif, alors que la croissance avec glucose a servi de témoin positif. Des comptes viables sur milieux gélosés et des mesures de densité optique ont été effectués afin de connaître le niveau de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. sur le fucoïdane et ses constituants principaux (galactose et fucose). L'ensemencement des différents milieux s'est effectué à partir du dernier préensemencement et a été standardisé à $5,61 \times 10^6$ UFC/mL pour les différents substrats. Les fermentations se sont déroulées dans un volume de 10 mL. Chaque fermentation des différents sucres a été répétée trois fois.

2.3.6 Comptes viables

À chaque heure, des dilutions des différentes fermentations ont été étalées sur boîte de Pétri pour déterminer les comptes viables. Le milieu gélosé est constitué de PCA (tryptone 0,5 %, extrait de levure 0,25 %, glucose 0,1 %, agar 0,9 %) avec de l'eau de mer. Les boîtes de Pétri ont été incubées à température pièce.

2.3.7 Densité optique

La densité optique a été mesurée à 650 nm à toutes les heures pendant douze heures, puis après vingt-quatre heures en utilisant le lecteur de densité optique BioPhotometer (Eppendorf, États-Unis). Des microcuvettes de 1 mL ont été utilisées.

2.3.8 Calcul du taux de croissance

Le taux de croissance de la bactérie fucosidase positive sur les différents sucres a été obtenu en calculant la pente de la courbe de croissance du temps zéro à la fin de la phase exponentielle. Le taux de croissance a été calculé pour les mesures de comptes viables et de densités optiques.

2.4 Résultats

2.4.1 Identification de la souche fucosidase positive

Les milieux de préenrichissements C et E ont favorisé la croissance de bactéries fucosidases positives. Sept colonies bactériennes ont été isolées (Fuc 1 à 7). Le séquençage de l'ARNr 16S des diverses colonies isolées a permis d'identifier ces bactéries comme étant des *Pseudoalteromonas* spp. proches génétiquement des *Pseudoalteromonas haloplanktis/elyakovii* isolées sans préenrichissement, mais phénotypiquement différentes (Figure 7). En effet, les *Pseudoalteromonas* spp. sont fucosidases positives et galactosidases négatives alors que les *P. haloplanktis/elyakovii* sont fucosidases négatives et galactosidase positives. Puisque les fragments d'ADNr16S des différentes souches de bactéries fucosidases positives sont identiques pour toutes les souches, une des souches a été choisie pour les tests subséquents, soit la souche Fuc 3.

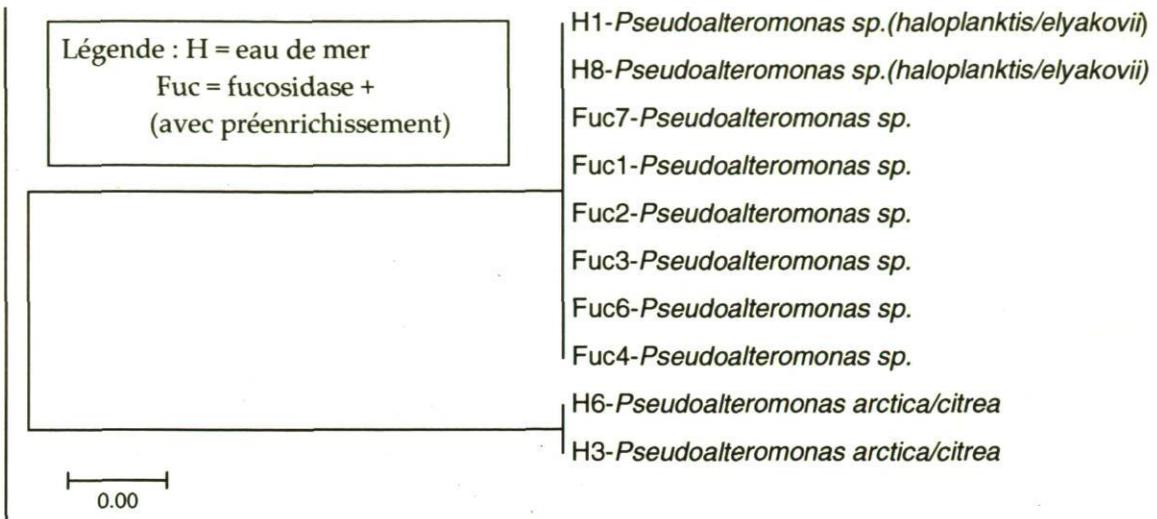


Figure 7- Arbre phylogénétique de toutes les souches de *Pseudoalteromonas* isolées à partir de l'eau de mer. (Les souches Fuc 1 à 7 sont fucosidases positives)

2.4.2 Densité optique

La standardisation de l'inoculum permet d'obtenir une densité optique semblable au début de la fermentation, peu importe le substrat utilisé. Par ailleurs, la densité optique reste similaire tout au long de la croissance microbienne pour tous les sucres utilisés. Par conséquent, l'utilisation du fucoïdane par la bactérie fucosidase positive ne peut être démontrée par la mesure de la densité optique puisqu'il n'y a pas de différence de croissance selon le sucre utilisé. La phase stationnaire est atteinte dans tous les cas après cinq heures d'incubation (Figure 8).

2.4.3 Comptes viables

Des comptes viables sur milieux gélosés ont permis de connaître le niveau de croissance de la souche *Pseudoalteromonas* sp. (Fuc 3) avec les différents sucres utilisés. Les comptes viables de *Pseudoalteromonas* sp. au début des fermentations sont d'environ $5,61 \times 10^6$ UFC/mL pour tous les sucres. Par ailleurs, les profils de croissance sont similaires pour tous les substrats utilisés. La phase stationnaire est atteinte, comme pour la densité optique, après cinq heures d'incubation, avec un compte de 2×10^9 UFC/mL (Figure 9)

2.4.4 Taux de croissance

Les taux de croissance sont relativement similaires pour tous les sucres (Tableau 7). Le glucose et le galactose permettent les taux de croissance de comptes viables les plus élevés alors que le fucose résulte en des taux de croissance plus faibles. Les taux de croissance calculés pour les mesures de densité optique sont dans tous les cas plus faibles que ceux calculés à partir des comptes viables.

Tableau 7 – Taux de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. (souche Fuc 3) en présence des différents sucres à 0,5 %

| Substrat | Taux de croissance comptes viables (écart-type (h ⁻¹)) | Taux de croissance densité optique (écart-type (h ⁻¹)) |
|----------------|--|--|
| Glucose | 1,2 (0,1) | 0,89 (0,08) |
| Fucose | 0,99 (0,04) | 0,89 (0,03) |
| Galactose | 1,2 (0,1) | 0,89 (0,08) |
| Fucoïdane | 1,05 (0,06) | 0,81 (0,06) |
| Témoin négatif | 1,087 (0,006) | 0,82 (0,06) |

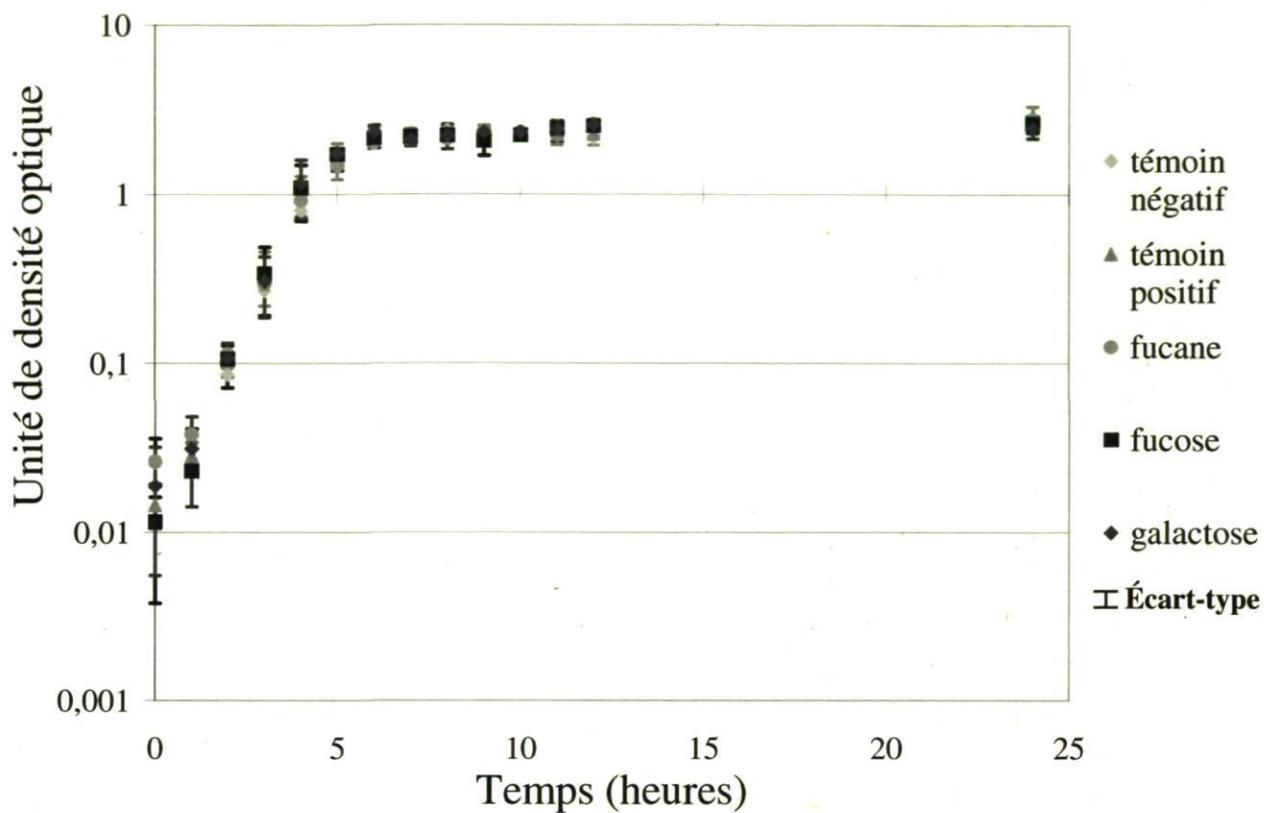


Figure 8- Suivi de la densité optique lors de la croissance de *Pseudoalteromonas* sp. sur différents substrats

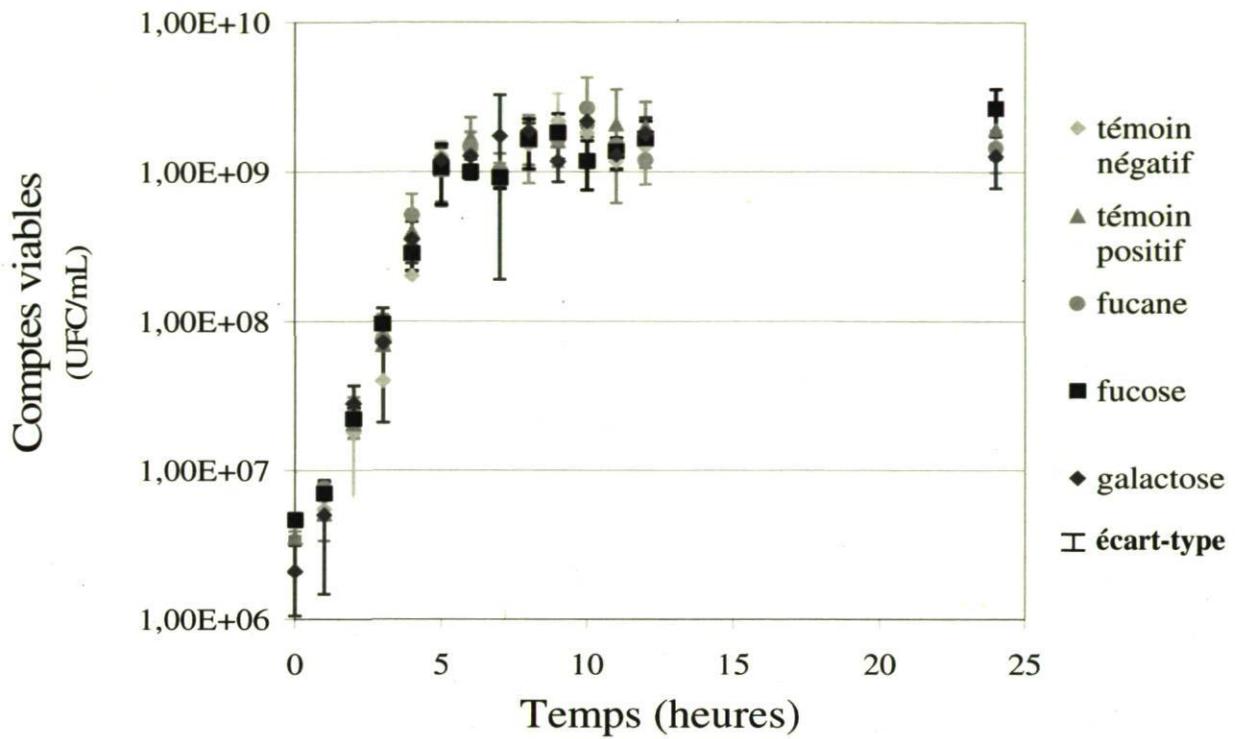


Figure 9- Suivi des comptes viables lors de la croissance de *Pseudoalteromonas* sp. sur différents substrats

2.5 Discussion

Les bactéries fucosidases positives isolées lors de cette étude s'apparentent à des *Pseudoalteromonas* spp. La littérature rapporte plusieurs *Pseudoalteromonas* comme métaboliquement très actives, produisant des protéinases et étant bactériolytiques, ce qui leur permet de compétitionner fortement avec les autres bactéries marines (Ivanova et al., 2002). Par conséquent, il est probable que les milieux de pré-enrichissement aient favorisé la croissance de *Pseudoalteromonas* spp. au détriment des autres bactéries, ce qui expliquerait que seule cette espèce ait été isolée comme étant fucosidase positive.

Les *Pseudoalteromonas* sont des bactéries retrouvées dans l'eau de mer qui sont souvent en association avec un hôte eucaryote. Les *Pseudoalteromonas* ont entre autres été isolés de diverses algues marines et de différents animaux comme les éponges, les mollusques et les tunicates. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, de 0,2 à 1,5 µm de diamètre sur 1,0 à 3,8 µm de longueur, non sporulés, non luminescents, souvent pigmentés, chimio-organotrophes, généralement aérobies stricts, à métabolisme respiratoire, oxydase positive, catalase positive et n'accumulant pas de poly-β-hydroxybutyrate. Les *Pseudoalteromonas* ont une bonne croissance à 20 °C et nécessitent l'eau de mer ou une concentration de sel entre 0,5 et 15 % pour croître. Les *Pseudoalteromonas* pigmentés sont généralement moins halophiles que les non pigmentées. Le pH optimal oscille entre 7.5 et 8. Les *Pseudoalteromonas* sont mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles polaires ou latéraux. La production d'enzymes, l'utilisation de différents substrats, la température de croissance et la concentration en sel nécessaire à la croissance et l'activité bactériolytique diffèrent selon les espèces (Annexes 7, 8, 9 et 10) (Gauthier et al., 1995 ; Raguene et al., 1996 ; Bozal., 1997 ; Bowman., 1998 ; Holmstrom et al., 1998 ; Sawabe et al., 1998, 2000 ; Ivanova et al., 1998, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004 ; Venkateswaran et Dohmoto., 2000 ; Egan et al., 2001 ; Onyshchenko et al., 2002 ; Kobayashi et al., 2003 ; Bakunina et al., 2003 ; Romanenko et al., 2003 ; Isnansetyo et Kamei., 2003).

Plusieurs espèces de *Pseudoalteromonas*, telles que *Pseudoalteromonas citrea*, *atlantica*, *carrageenova* et *issachenkonii*, produisent des enzymes capables d'hydrolyser les polysaccharides présents au niveau des algues, dont le fucoïdane (Yaphé et Morgan., 1959 ; Bakunina et al., 2002 ; Ivanova et al., 2002 ; 2003). La présence d'enzymes dégradant le fucoïdane chez les souches de *Pseudoalteromonas* sp. isolées est donc en concordance avec la littérature.

Certaines études ont démontré que les caractéristiques épigénétiques ou phénotypiques au sein d'une même espèce, par exemple chez *P. citrea*, sont diverses et varient grandement. L'expression de certains gènes au sein d'une même espèce peut être dépendante de la pression environnementale. Ainsi, le changement de saison, le type trophique, la sélection d'espèces et la dynamique des populations vont entraîner une fluctuation dans l'expression des activités ectoenzymatiques. Par conséquent, une même espèce peut produire ou non certaines enzymes selon l'habitat d'où elle a été extraite. Par exemple, lors de l'étude de Bakunina et collaborateurs (2002), les activités respectives de la fucoïdane hydrolase, de la fucosidase et de la β -galactosidase chez *P. citrea* varient entre 0 à 1920 nmol/h par mg de protéine, entre 0 et 50 nmol/min par mg de protéines et entre 0 et 300 nmol/min par mg de protéines. Cette variation des caractéristiques phénotypiques par pression environnement pourrait expliquer les différences obtenues au niveau de l'expression de la β -galactosidase et de l' α -L-fucosidase entre les souches de *P. elyakovii* isolées de l'eau de mer sans préenrichissement et les souches de *Pseudoalteromonas* sp. isolées des préenrichissements.

Les comptes viables et les mesures de densité optique n'ont pas démontré de différences significatives entre le témoin négatif, le témoin positif et les différents sucres utilisés, ce qui ne démontre pas que la souche soit en mesure d'utiliser les sucres. Cependant, *Pseudoalteromonas* est une bactérie qui est en mesure de survivre dans des milieux marins pauvres par ajustement des voies métaboliques (Ivanova et al., 2002), ce qui pourrait expliquer que la présence et la sorte de sucre utilisé n'a pas eu d'influence significative sur la croissance microbienne. De plus, les bactéries marines sont fortement protéolytiques, pouvant donc expliquer sa forte croissance sur le milieu de base (Ivanova et al., 2003). À cet égard, la souche de *Pseudoalteromonas* isolée pourrait donc possiblement croître grâce aux ingrédients azotés tels que la peptone et l'extrait de levure. Cette utilisation des suppléments azotés entraînerait une augmentation du pH du milieu à cause de la désamination des acides aminés

utilisé comme source de carbone à des fins énergétique, résultant en une libération subséquente d'ammonium. Cependant, aucune prise du pH n'a été effectuée lors des comptes viables et cette hypothèse ne peut donc pas être vérifiée. Par ailleurs, la peptone provenant de BD diagnostic est constitué de protéines animales digérées de façon enzymatique qui contiennent une forte quantité d'azote, de peptone et d'acides aminés disponibles pour la croissance bactérienne et dans des quantités négligeables, des protéoses. Cependant, cette quantité négligeable de protéose peut tout de même avoir influencé la croissance microbienne. De plus, l'extrait de levure provenant de *Saccharomyces cerevisiae* contient un mélange de peptides, d'acides aminés, de carbohydrates simples et complexes et de vitamines. Les carbohydrates contenus dans l'extrait de levure peuvent aussi avoir servi de source de sucres pour la croissance de *Pseudoalteromonas* pouvant expliquer l'absence de différence de croissance microbienne du témoin négatif par rapport au témoin positif. Par conséquent, la démonstration de l'hydrolyse du fucoïdane devra se faire par une autre méthode.

2.6 Conclusion

L'utilisation des milieux de préenrichissement C et E ont permis l'isolement de sept souches bactériennes fucosidases positives. Ces souches sont des toutes *Pseudoalteromonas* proches génétiquement des souches de *Pseudoalteromonas elyakovii* isolées sans préenrichissement, mais phénotypiquement différentes dans leur production enzymatique. Des différences phénotypiques au sein d'une même espèce ont aussi été reportées dans la littérature pour les bactéries *Pseudoalteromonas*. De plus, une croissance très rapide est observée. Ainsi, les comptes viables passent de $5,61 \times 10^6$ UFC/mL à 2×10^9 UFC/mL après seulement 5 heures d'incubation. De surcroît, aucune différence significative n'a été observée par rapport à la densité optique, aux comptes viables et au taux de croissance selon le sucre utilisé. Par conséquent, l'utilisation des sucres par la souche devra être démontrée par des tests enzymatiques.

Chapitre 3

Cinétiques enzymatiques de la fucosidase et de la fucoïdane hydrolase

3.1 Résumé

L'hydrolyse des fucoïdanes amplifie plusieurs de ces activités biologiques de même que sa mobilité et sa diffusion vers les différents organes. L'hydrolyse peut se faire de façon enzymatique ou chimique, mais la méthode enzymatique est davantage souhaitable, car elle ne modifie pas la composition du fucoïdane. Deux enzymes capables d'hydrolyser le fucoïdane ont été découvertes chez une souche de *Pseudoalteromonas*, nommée Fuc-3. Le dosage des activités enzymatiques de type fucosidase et fucoïdane hydrolase des extraits bruts de biomasse de la souche *Pseudoalteromonas* Fuc 3 été déterminé par la mesure de la libération du nitrophénol lors de l'hydrolyse du PNP- α -L-Fucoside, ainsi que par le dosage des sucres réducteurs. L'activité spécifique de la fucosidase, optimisée à 20 °C, est d'environ 0,014 U/mg et elle est constante dans le temps. La saturation de l'enzyme est atteinte après l'utilisation de 0,08 mL de PNP- α -L-Fucoside. Par ailleurs, le pH a très peu d'effet sur l'activité fucosidase. Celle de la fucoïdane hydrolase atteint sa valeur maximale de 0,67 U/mg après une heure d'incubation et est optimale à 50 °C. La concentration de saturation est de 0,4 mg/mL et le pH tend à faire augmenter l'activité.

3.2 Introduction

Au cours des dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour les fucoïdanes à cause de leurs activités biologiques reconnues qui procurent des effets bénéfiques chez l'humain. Cependant, leur masse moléculaire importante et leur viscosité élevée nuisent à leur utilisation comme agent actif biologiquement (Choi et *al.*, 2009). Par conséquent, l'utilisation d'une préparation d'enzymes hydrolysant le fucoïdane en fusooligosaccharide permettrait d'amplifier les activités biologiques de ce polysaccharide. La fucane sulfate hydrolase (E.C.3.2.1.44), aussi appelée fucoïdanase, et l' α -L-fucosidase (E.C.3.2.1.51) (Berteau et Mulloy, 2003) sont deux enzymes produites par des bactéries et capables d'hydrolyser le fucoïdane en oligosaccharides. Ces enzymes peuvent être intracellulaires ou extracellulaires. Malheureusement, aucune fucoïdanase n'est disponible commercialement (Holtkamp et *al.*, 2009). Par ailleurs, l'utilisation d'un milieu de culture adéquat est ardue parce que le milieu doit favoriser à la fois la croissance de la bactérie de même que sa production de l'enzyme. Par conséquent, l'utilisation d'une solution d'enzyme plutôt que du microorganisme producteur de l'enzyme peut être préférable étant donné que les conditions pourront être sélectionnées pour favoriser l'activité enzymatique plutôt que la croissance du microorganisme.

L'obtention d'un extrait protéique permet la mise en contact des enzymes bactériennes avec le substrat sans nécessiter la croissance de la bactérie. De plus, l'utilisation de l'extrait protéique permettra de déterminer les conditions optimales pour les activités enzymatiques. Ces conditions pourront ensuite être choisies lors de la synthèse d'oligosaccharide au niveau industrielle. Enfin, ultérieurement, les enzymes bactériennes pourront être fixées à une matrice pour être utilisées au niveau industriel.

3.3. Matériels et méthodes

3.3.1 Obtention de l'extrait protéique

Un inoculum de 1 % du 3^e préenrichissement a été fait dans 350 mL de *Marine Broth* et incubé à température pièce avec une agitation de 200 rpm. Les cellules bactériennes ont été récupérées à la fin de la phase exponentielle (cinq heures) par une centrifugation à 9600 x g à

4 °C. Par la suite, deux lavages dans du tampon phosphate potassium (KPB) 100 mM, pH 7,2 ont été effectués pour éliminer toute trace de milieu de culture. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 10 mL d'une solution de KPB contenant deux inhibiteurs de protéases, soit 57,4 µL de phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) (Biosynth chemistry & biology, Suisse) 100 mM et 20 µL d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) (VWR, Pays-Bas) 500 mM. La suspension bactérienne, maintenue à 4 °C, a été lysée par une sonication à 20 kHz, $\lambda=25$ % avec trois séries de pulsations de vingt secondes à l'aide du «Digital sonifier» (Branson, États-Unis). Une centrifugation à 12 000 x g à 4 °C pendant trente minutes a permis d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été utilisé comme solution enzymatique pour les tests subséquents. Par ailleurs, le surnageant de culture cellulaire lors des lavages a été testé pour la présence d'enzyme et n'a démontré aucune activité enzymatique.

3.3.2 Quantification protéique

La courbe étalon a été effectuée par la méthode de Bradford avec l'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) comme standard aux concentrations 0 ; 0,1 ; 0,250 ; 0,500 ; 0,750 ; 1 et 1,5 mg/mL. Cette courbe a ensuite été utilisée pour déterminer la quantité de protéines extraites selon la DO obtenue à 595 nm. La quantité de protéines extraites à partir de la culture de 350 mL de *Marine Broth* est d'environ 1,5 mg/mL

3.3.3 Activité fucosidase

3.3.3.1 Mesure de l'activité

L'activité enzymatique α -L-fucosidase a été déterminée par la mesure d'absorbance à 400 nm lors de la libération du nitrophénol par suite de l'hydrolyse du 4-nitrophenyl-alpha-L-fucopyranoside (PNP α -L-fuc) (Biosynth chemistry & biology, Suisse) (figure 8). La réaction enzymatique était composée de 0,025 µL d'extrait bactérien, de PNP α -L-fuc 10 mM et de tampon phosphate 100 mM, pH 7 pour compléter le volume à 0,250 µL selon la quantité de substrat utilisée. La réaction a ensuite été arrêtée par l'ajout de 0,750 µL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 1M. Un témoin négatif a été réalisé.

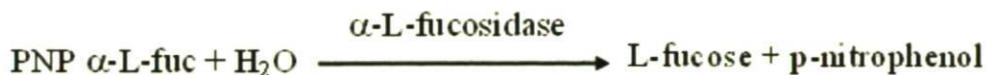


Figure 10- Réaction d'hydrolyse du PNP α -L-fuc

La densité optique a été prise à l'aide du thermo spectro (Heλios α , Etats-Unis). L'activité spécifique est définie comme la quantité d'enzyme dans 1 mg de protéine libérant 1 μ mol de p-nitrophénol par heure.

3.3.3.2 Détermination de la concentration de substrat, du temps, de la température et du pH sur l'activité fucosidase

Dans un premier temps, l'effet des différents facteurs sur l'activité enzymatique a été testé séparément en gardant les autres facteurs fixes. Le standard est incubé avec 125 μ L de PNP α -L-fuc, à 20 °C, à pH 7.2 pendant cinq heures. Dans un deuxième temps, les facteurs ont été testés conjointement pour déterminer les optimums des facteurs conjoints grâce à un «central composite design» (CCD) (Tableau 8).

Pour tester le seuil de saturation de l'enzyme fucosidase, des volumes de 0 ; 5 ; 25 ; 62,5 et 125 μ L de PNP α -L-fuc ont été utilisés. La libération du nitrophénol et l'activité enzymatique ont été observées dans le temps de zéro à six heures d'incubation avec des prises de mesure aux 2 heures. L'activité enzymatique de la fucosidase a été testée aux températures de 4, 20, 37, 50 et 65 °C. Les pH 3, 6, 7, 8 et 11 ont été testés pour vérifier l'effet du pH au niveau de l'activité enzymatique.

Tableau 8- CCD pour la fucosidase

| Essai | Ordre | pH | Température (°C) | Temps (heures) | Volume de PNPf (mL) |
|-------|-------|----|------------------|----------------|---------------------|
| 29 | 1 | 7 | 35 | 2 | 0,08 |
| 27 | 2 | 7 | 35 | 2 | 0,08 |
| 15 | 3 | 6 | 50 | 2,5 | 0,11 |
| 5 | 4 | 6 | 20 | 2,5 | 0,05 |
| 12 | 5 | 8 | 50 | 1,5 | 0,11 |
| 11 | 6 | 6 | 50 | 1,5 | 0,11 |
| 1 | 7 | 6 | 20 | 1,5 | 0,05 |
| 17 | 8 | 5 | 35 | 2 | 0,08 |
| 4 | 9 | 8 | 50 | 1,5 | 0,05 |
| 24 | 10 | 7 | 35 | 2 | 0,14 |
| 23 | 11 | 7 | 35 | 2 | 0,02 |
| 25 | 12 | 7 | 35 | 2 | 0,08 |
| 19 | 13 | 7 | 5 | 2 | 0,08 |
| 13 | 14 | 6 | 20 | 2,5 | 0,11 |
| 18 | 15 | 9 | 35 | 2 | 0,08 |
| 26 | 16 | 7 | 35 | 2 | 0,08 |
| 9 | 17 | 6 | 20 | 1,5 | 0,11 |
| 7 | 18 | 6 | 50 | 2,5 | 0,05 |
| 16 | 19 | 8 | 50 | 2,5 | 0,11 |
| 14 | 20 | 8 | 20 | 2,5 | 0,11 |
| 20 | 21 | 7 | 65 | 2 | 0,08 |
| 30 | 22 | 7 | 35 | 2 | 0,08 |
| 2 | 23 | 8 | 20 | 1,5 | 0,05 |
| 3 | 24 | 6 | 50 | 1,5 | 0,05 |
| 22 | 25 | 7 | 35 | 3 | 0,08 |
| 28 | 26 | 7 | 35 | 2 | 0,08 |
| 10 | 27 | 8 | 20 | 1,5 | 0,11 |
| 31 | 28 | 7 | 35 | 2 | 0,08 |
| 8 | 29 | 8 | 50 | 2,5 | 0,05 |
| 21 | 30 | 7 | 35 | 1 | 0,08 |
| 6 | 31 | 8 | 20 | 2,5 | 0,05 |

3.3.4 Activité fucoïdane hydrolase

3.3.4.1 Courbe de calibration de fucose

La courbe de calibration des sucres réducteurs a été effectuée par la méthode de Nelson et Somogyi avec le fucose comme standard aux quantités de 0, 40, 80, 120, 160 et 200 µg. Cette courbe a ensuite été utilisée pour la détermination de la quantité de sucres réducteurs produits lors de l'hydrolyse du fucoïdane selon la DO obtenue à 500 nm à l'aide du thermo spectro (Helios α, Etats-Unis).

3.3.4.2 Mesure de l'activité fucoïdane hydrolase

L'activité de la fucoïdane hydrolase a été déterminée par une mesure d'analyse colorimétrique de la libération des sucres réducteurs (Nelson et Somogyi (figure 9 ; annexe 6)) en comparaison avec la courbe de calibration du fucose. Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme dans 1 mg de protéines qui catalyse la formation de 1 µmol de sucres réducteurs en une heure.

La solution de réaction était constituée d'extrait protéique bactérien comme source d'enzyme et d'une solution substrat contenant 4 mg de fucoïdane par mL de KPB 50 mM, pH 7.2. La réaction a ensuite été incubée à 20 °C pendant cinq heures. Deux contrôles ont été effectués, un contenant 0,1 mL d'extrait protéique dans 0,4 mL de KPB et un contenant 0,1 mL de KPB dans 0,4 mL de la solution substrat.

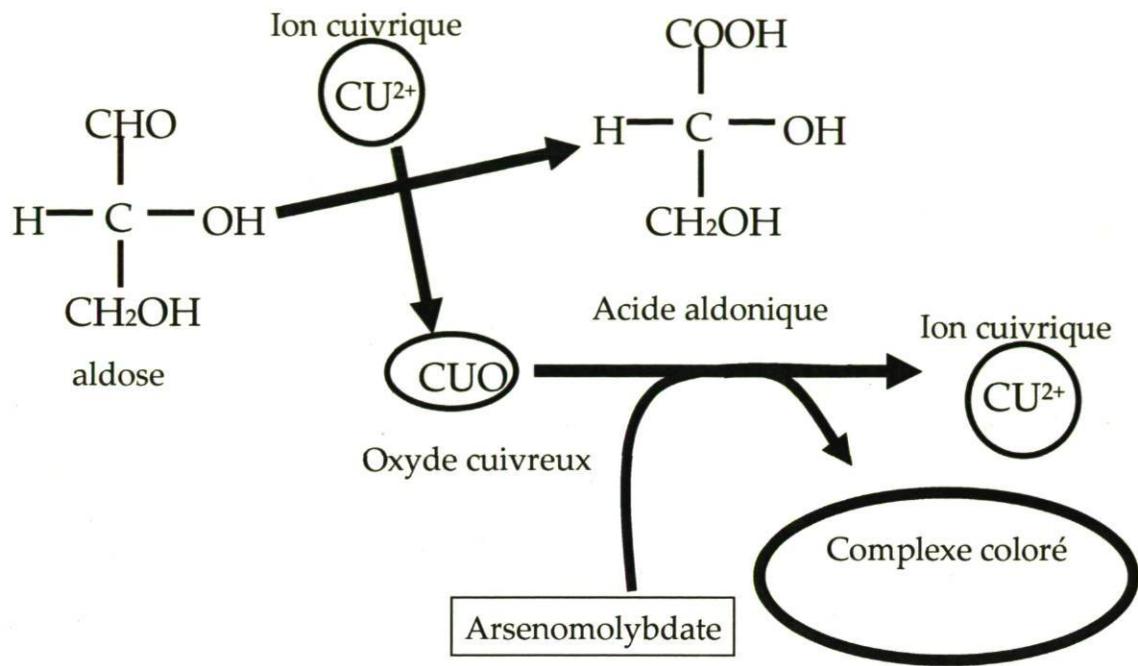


Figure 11- Réaction de Nelson et Somogyi

3.3.4.3 Détermination de la concentration de substrat, du temps, de la température et du pH sur l'activité fucoïdane hydrolase

Dans un premier temps, l'effet des différents facteurs sur l'activité enzymatique a été testé séparément en gardant les autres facteurs fixes. Le standard est incubé avec du fucoïdane à une concentration finale de 3,2 mg /mL, à 20 °C, à pH 7.2 pendant cinq heures.

Pour tester le seuil de saturation de l'enzyme fucoïdane hydrolase, des concentrations de 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,6 et 3,2 mg/mL de fucoïdane ont été utilisés. L'activité enzymatique a été observée dans le temps de 0 à 7 heures d'incubation avec des prises de mesure aux heures. L'activité enzymatique a aussi été testée aux températures de 4, 20, 37, 50 et 65 °C. Les pH 3, 6, 7 et 8 ont été testés pour vérifier l'effet du pH au niveau de l'activité enzymatique.

3.4. Résultats

3.4.1 Activité fucosidase

Une augmentation de l'activité enzymatique est observée avec l'augmentation du substrat jusqu'à l'obtention d'un plateau après 0,08 mL de PNPf (Figure 12). L'activité maximale est autour de 0,009 U/mg de protéine.

Une augmentation linéaire de la libération du nitrophénol est observée avec le temps. L'activité enzymatique est donc constante dans le temps. Cette activité est de 0,011 U/mg de protéines (Figure 13).

L'activité enzymatique de la fucosidase a été testée en fonction de la température d'incubation (Figure 14). Une haute activité est observée autour de 20 °C et est de 0,014 U/mg de protéines. Au-delà de cette température, il y a une décroissance de l'activité enzymatique possiblement causée par une dénaturation de l'enzyme.

L'effet du pH sur l'activité enzymatique a été étudié (Figure 15). L'activité enzymatique est d'environ 0,015 U/mg pour tous les pH sauf pour le pH 3 qui semble avoir eu un effet positif sur l'activité enzymatique.

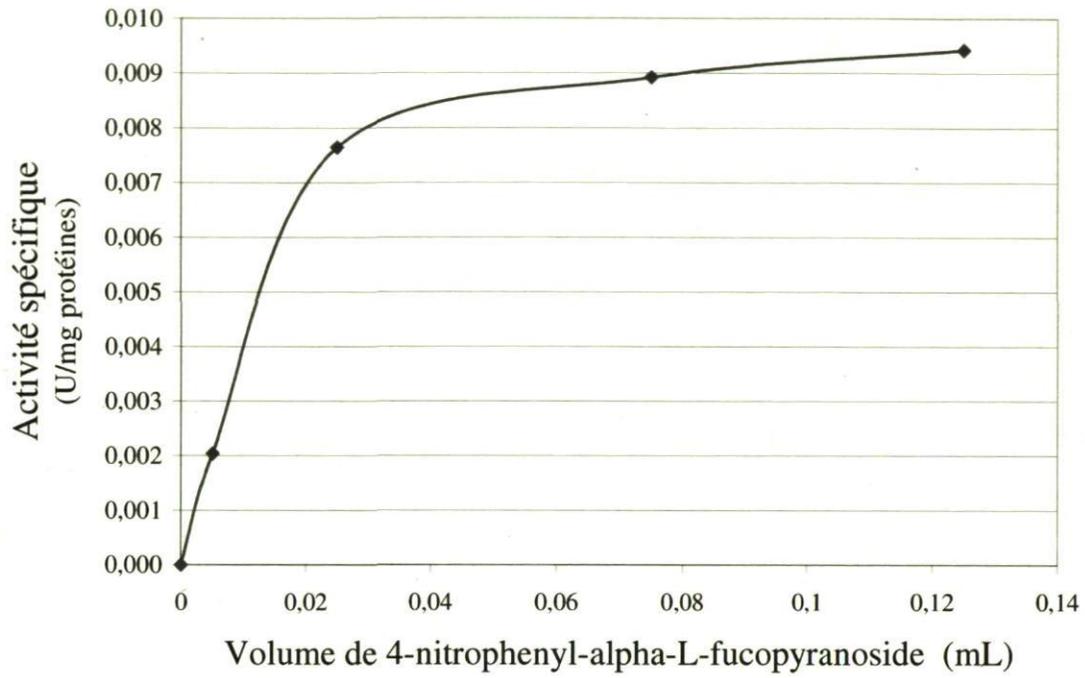


Figure 12- Activité fucosidase en fonction du volume de 4-nitrophenyl-alpha-L-fucopyranoside (PNPF) utilisé

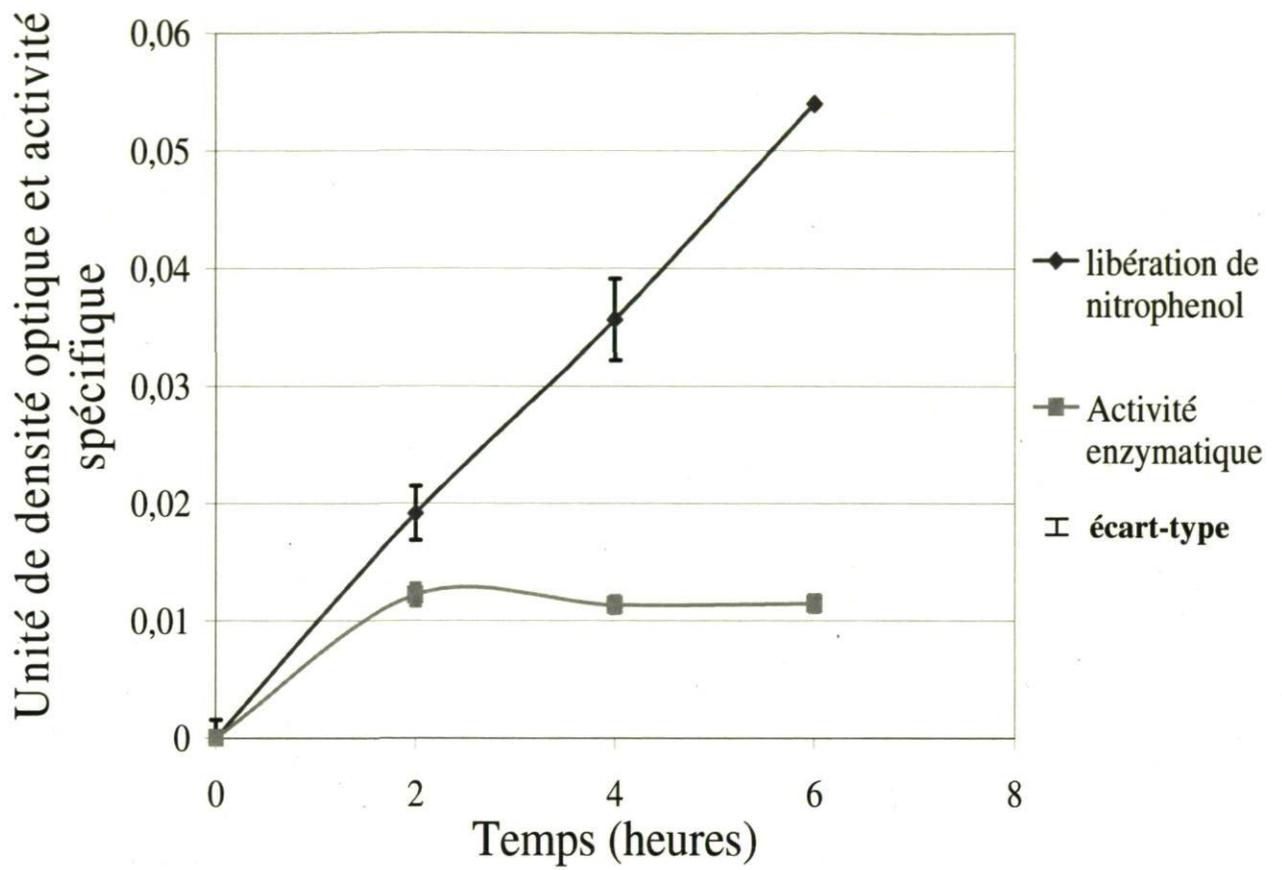
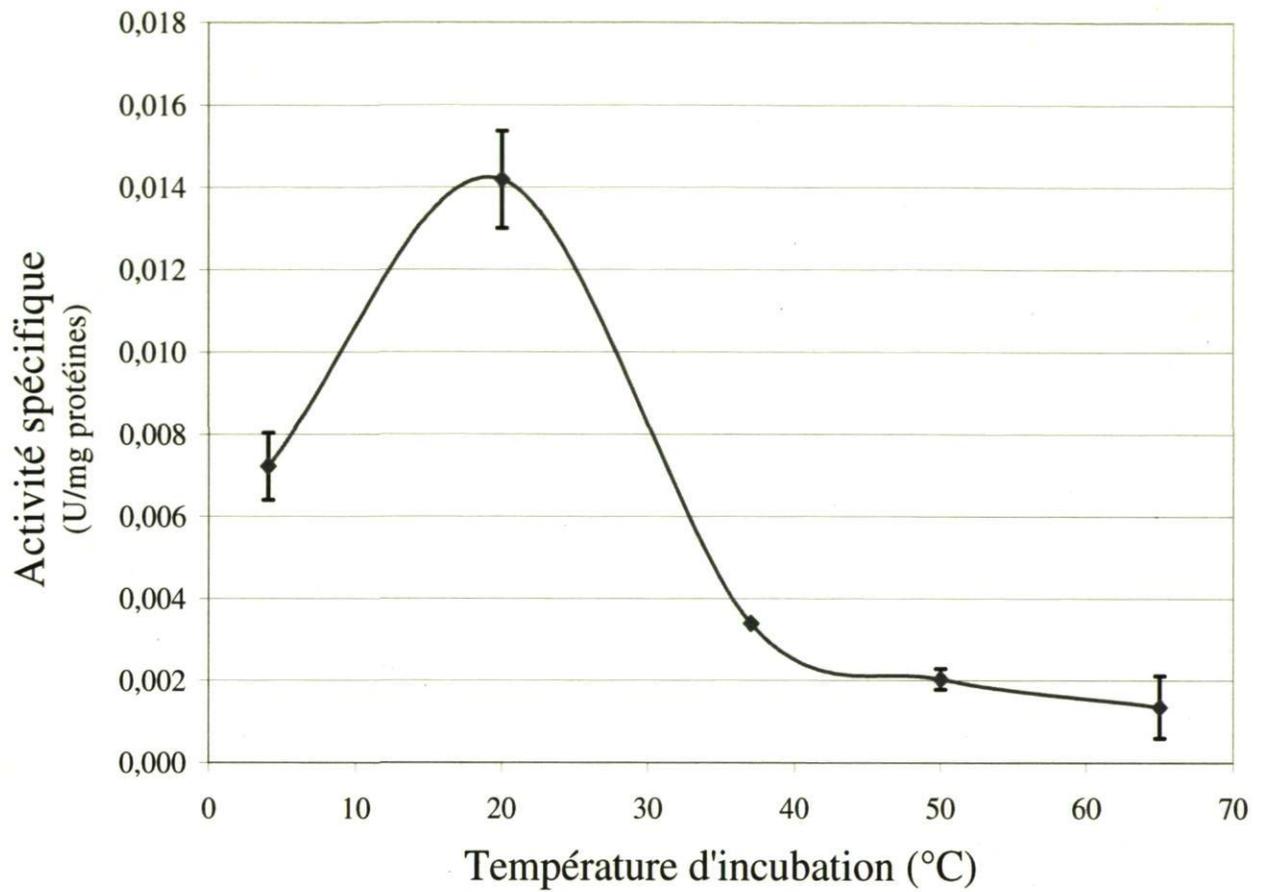
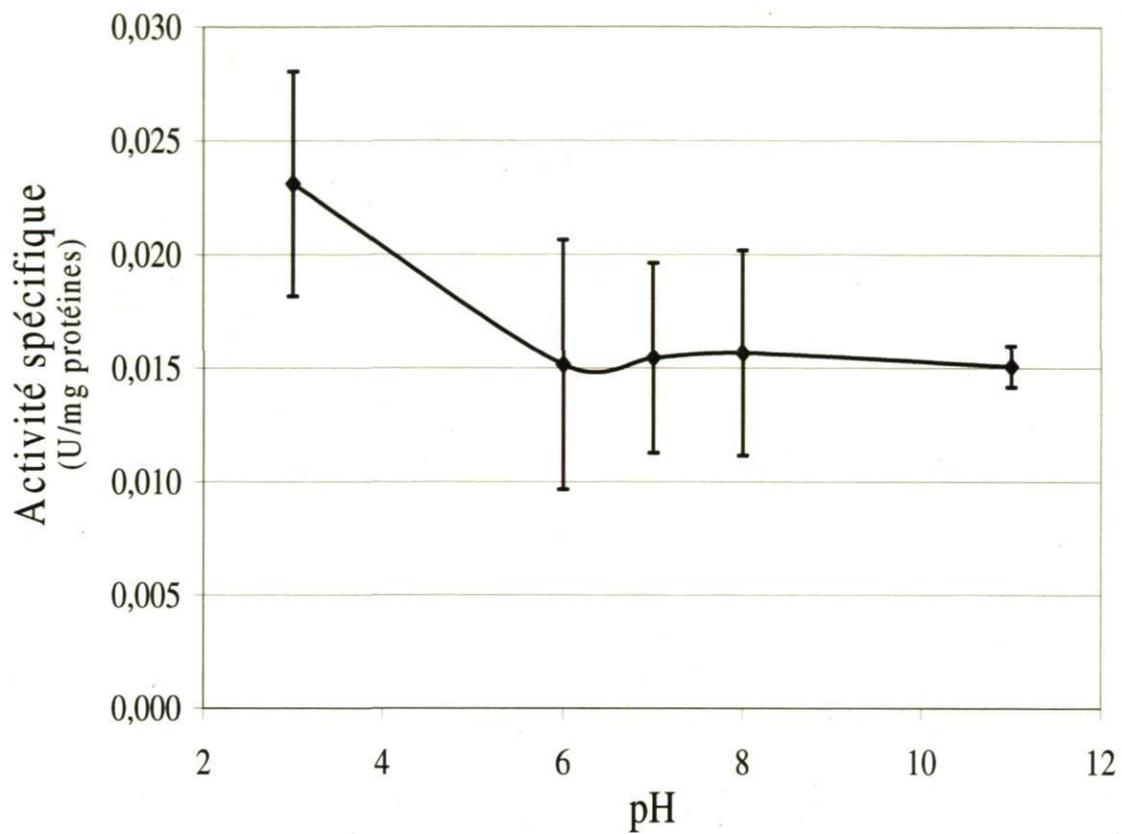


Figure 13- Activité fucosidase et de la libération de nitrophenol en fonction du temps



Légende : \pm écart-type

Figure 14- Activité fucosidase en fonction de la température d'incubation



Légende : \pm écart-type

Figure 15- Activité fucosidase en fonction du pH

3.4.2.1 Étude des conditions expérimentales sur l'activité fucosidase par un dispositif central composite

Les paramètres retenus pour le «central composite design» furent choisis à partir des résultats d'activités obtenus précédemment. L'activité fucosidase, la température (35°C), le pH (7), le temps de réaction (deux heures) et le volume de PNPF (0,08 mL) furent choisis comme conditions centrales pour le «central composite design» (CCD) pour optimiser l'activité de l' α -L-fucosidase produite par *Pseudoalteromonas* spp. L'activité fucosidase de *Pseudoalteromonas* (Fuc-3) n'a pas été comparée à une enzyme commerciale. Les résultats d'activités pour la souche Fuc 3 sont présentés au tableau 9. L'activité fucosidase à 35°C est beaucoup plus élevée que celle obtenue précédemment à 37°C. Il est possible que cette différence d'activité soit due au temps d'incubation différent qui était de 2 heures à 35°C et de 5 heures à 37°C. Un temps d'incubation plus long induisant une dénaturation de l'enzyme par la présence possible de protéases et causant une perte d'activité.

Tableau 9- CCD des variables et réponse de l'activité fucosidase

| Essai | Ordre | pH | Température (°C) | Temps (heures) | Volume (mL) | Activité fucosidase (Unit/mg protéines) |
|-------|-------|----|------------------|----------------|-------------|---|
| 29 | 1 | 7 | 35 | 2 | 0,08 | 0,206 |
| 27 | 2 | 7 | 35 | 2 | 0,08 | 0,183 |
| 15 | 3 | 6 | 50 | 2,5 | 0,11 | 0,046 |
| 5 | 4 | 6 | 20 | 2,5 | 0,05 | 0,188 |
| 12 | 5 | 8 | 50 | 1,5 | 0,11 | 0,085 |
| 11 | 6 | 6 | 50 | 1,5 | 0,11 | 0,053 |
| 1 | 7 | 6 | 20 | 1,5 | 0,05 | 0,251 |
| 17 | 8 | 5 | 35 | 2 | 0,08 | 0,233 |
| 4 | 9 | 8 | 50 | 1,5 | 0,05 | 0,032 |
| 24 | 10 | 7 | 35 | 2 | 0,14 | 0,250 |
| 23 | 11 | 7 | 35 | 2 | 0,02 | 0,111 |
| 25 | 12 | 7 | 35 | 2 | 0,08 | 0,246 |
| 19 | 13 | 7 | 5 | 2 | 0,08 | 0,095 |
| 13 | 14 | 6 | 20 | 2,5 | 0,11 | 0,237 |
| 18 | 15 | 9 | 35 | 2 | 0,08 | 0,172 |
| 26 | 16 | 7 | 35 | 2 | 0,08 | 0,212 |
| 9 | 17 | 6 | 20 | 1,5 | 0,11 | 0,323 |
| 7 | 18 | 6 | 50 | 2,5 | 0,05 | 0,041 |
| 16 | 19 | 8 | 50 | 2,5 | 0,11 | 0,040 |
| 14 | 20 | 8 | 20 | 2,5 | 0,11 | 0,225 |
| 20 | 21 | 7 | 65 | 2 | 0,08 | 0,032 |
| 30 | 22 | 7 | 35 | 2 | 0,08 | 0,223 |
| 2 | 23 | 8 | 20 | 1,5 | 0,05 | 0,228 |
| 3 | 24 | 6 | 50 | 1,5 | 0,05 | 0,092 |
| 22 | 25 | 7 | 35 | 3 | 0,08 | 0,156 |
| 28 | 26 | 7 | 35 | 2 | 0,08 | 0,210 |
| 10 | 27 | 8 | 20 | 1,5 | 0,11 | 0,284 |
| 31 | 28 | 7 | 35 | 2 | 0,08 | 0,213 |
| 8 | 29 | 8 | 50 | 2,5 | 0,05 | 0,035 |
| 21 | 30 | 7 | 35 | 1 | 0,08 | 0,297 |
| 6 | 31 | 8 | 20 | 2,5 | 0,05 | 0,165 |

L'analyse statistique révèle que l'activité fucosidase moyenne des essais effectués lors du «central composite design» (CCD) est de 0,167 avec un coefficient de détermination (R^2) de 0,83. La racine de la moyenne des erreurs carrées (RMSE) donne un ordre de grandeur de la variabilité de l'erreur autour d'un point. Un RMSE de 0,05 et une valeur moyenne de 0,167 (coefficient de variation de 30%) permettent de conclure que la variabilité autour d'un point n'est pas négligeable.

Par ailleurs, au moins un des facteurs quadratiques du CCD est statistiquement significatif et il ne semble pas y avoir d'interaction entre les facteurs (Tableau 10). L'analyse de la variance (Tableau 11) révèle que seul le terme quadratique de la température est statistiquement

significatif ($p=0,0005$). Ce résultat indique que seulement la température fait varier suffisamment l'activité fucosidase pour que son effet ne soit pas masqué par la variabilité des mesures. La signification du terme quadratique indique que l'activité fucosidase n'est pas linéaire lorsqu'on fait varier la température.

Tableau 10- Analyse statistique des facteurs linéaires et quadratique et de l'interaction entre les facteurs

| Régression | DL | Type I Somme des carrés | R-carré | F calculé | Pr > F |
|---------------------|-----------|-------------------------|---------------|-------------|---------------|
| Linéaire | 4 | 0.139364 | 0.5889 | 13.68 | <.0001 |
| Quadratique | 4 | 0.051162 | 0.2162 | 5.02 | 0.0081 |
| Produit croisé | 6 | 0.005402 | 0.0228 | 0.35 | 0.8974 |
| Total Modèle | 14 | 0.195928 | 0.8279 | 5.50 | 0.0009 |

Tableau 11- Analyse de la variance

| Paramètres | DL | Estimé | Erreur Type | Valeur t | Pr > t | Paramètres estimés |
|-------------------------|----|------------|-------------|----------|---------|--------------------|
| Intercept | 1 | 0.090343 | 0.728028 | 0.12 | 0.9028 | 0.213347 |
| Température | 1 | 0.006182 | 0.007752 | 0.80 | 0.4369 | -0.133380 |
| pH | 1 | 0.047466 | 0.148664 | 0.32 | 0.7536 | -0.021598 |
| Temps | 1 | -0.125863 | 0.249796 | -0.50 | 0.6212 | -0.054361 |
| Volume | 1 | 2.864760 | 3.922630 | 0.73 | 0.4758 | 0.044896 |
| Température*Température | 1 | -0.000183 | 0.000041937 | -4.37 | 0.0005 | -0.165109 |
| pH*Température | 1 | 0.000244 | 0.000841 | 0.29 | 0.7752 | 0.014656 |
| pH*pH | 1 | -0.006555 | 0.009436 | -0.69 | 0.4972 | -0.026220 |
| Temps*Température | 1 | 0.001420 | 0.001682 | 0.84 | 0.4108 | 0.042613 |
| Temps*pH | 1 | 0.005337 | 0.025229 | 0.21 | 0.8352 | 0.010673 |
| Temps*Temps | 1 | -0.001927 | 0.037744 | -0.05 | 0.9599 | -0.001927 |
| Volume*Température | 1 | -0.029205 | 0.028032 | -1.04 | 0.3130 | -0.052569 |
| Volume*pH | 1 | 0.178548 | 0.420486 | 0.42 | 0.6768 | 0.021426 |
| Volume*Temps | 1 | -0.098234 | 0.840972 | -0.12 | 0.9085 | -0.005894 |
| Volume*Volume | 1 | -13.423081 | 10.484306 | -1.28 | 0.2187 | -0.048323 |

| Facteur | DL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F calculé | Pr > F | Paramètres |
|-------------|----|------------------|--------------------|-----------|--------|-------------|
| Température | 5 | 0.160257 | 0.032051 | 12.59 | <.0001 | Temperature |
| pH | 5 | 0.004815 | 0.000963 | 0.38 | 0.8563 | pH |
| Temps | 5 | 0.019702 | 0.003940 | 1.55 | 0.2309 | Temps |
| Volume | 5 | 0.019524 | 0.003905 | 1.53 | 0.2349 | Volume |

L'étude du modèle dans le domaine défini par les valeurs des variables étudiées permet d'obtenir les résultats suivants. La valeur d'activité fucosidase maximale (0,32) serait obtenue pour une valeur de température de 21,6°C, pour un pH de 6,6, pour un temps de 1,2 et un volume de 0,10 (Tableau 12). Comme le pH et le volume varient peu, la surface de réponse avec le temps et la température (en supposant pH=6,6 et volume=0,10) est présentée sur la figure 16. Cette figure montre clairement que l'activité fucosidase augmente constamment avec le temps et qu'un maximum est atteint pour une valeur de température autour de 20°C.

Tableau 12- Estimation de la réponse maximale de la fucosidase

| Estimation de la réponse maximale pour la variable fucosidase | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|----------------------|----------|----------|----------|
| Coded Radius | Réponse estimée | Erreur standard | Valeurs des facteurs | | | |
| | | | Température | pH | Temps | Volume |
| 0.0 | 0.213347 | 0.019071 | 35.000000 | 7.000000 | 2.000000 | 0.080000 |
| 0.1 | 0.227648 | 0.018996 | 32.541705 | 6.967748 | 1.956823 | 0.082044 |
| 0.2 | 0.240407 | 0.018812 | 30.452257 | 6.929396 | 1.899155 | 0.084492 |
| 0.3 | 0.252077 | 0.018654 | 28.717855 | 6.887908 | 1.829539 | 0.087087 |
| 0.4 | 0.263001 | 0.018753 | 27.272493 | 6.845548 | 1.751248 | 0.089639 |
| 0.5 | 0.273414 | 0.019416 | 26.044182 | 6.803506 | 1.667005 | 0.092051 |
| 0.6 | 0.283473 | 0.020958 | 24.975086 | 6.762240 | 1.578727 | 0.094291 |
| 0.7 | 0.293282 | 0.023606 | 24.023360 | 6.721842 | 1.487697 | 0.096358 |
| 0.8 | 0.302914 | 0.027445 | 23.159579 | 6.682254 | 1.394766 | 0.098266 |
| 0.9 | 0.312419 | 0.032448 | 22.363000 | 6.643367 | 1.300503 | 0.100032 |
| 1.0 | 0.321834 | 0.038538 | 21.618780 | 6.605065 | 1.205295 | 0.101675 |

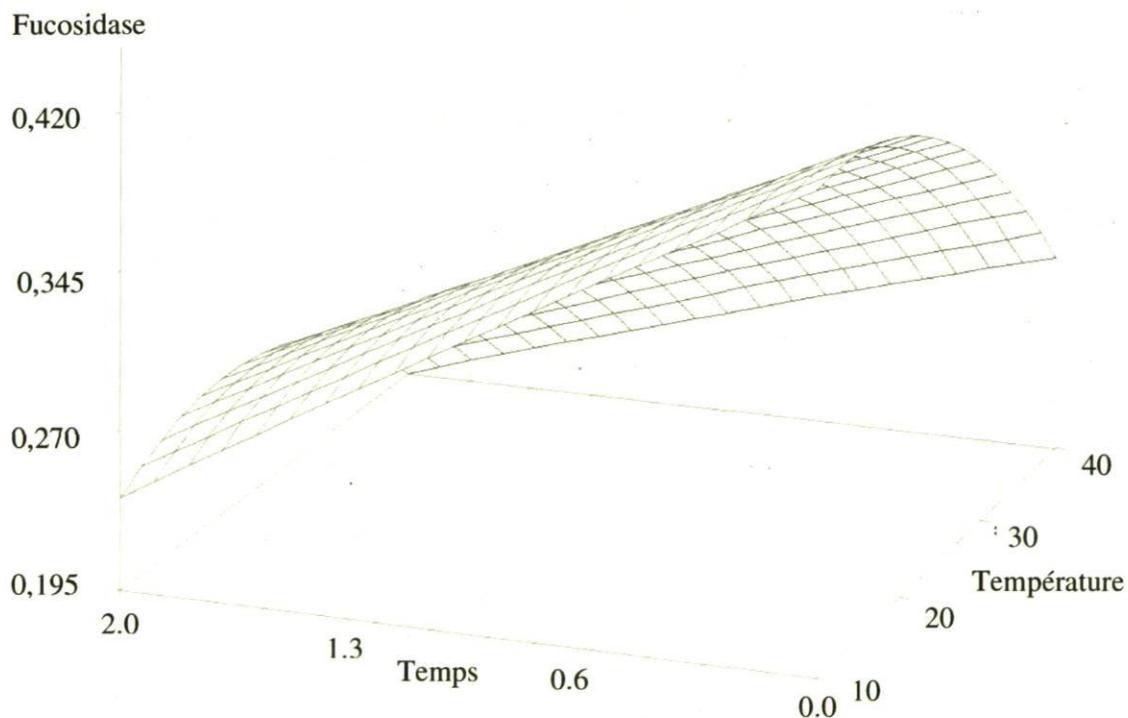


Figure 16- Activité fucosidase en fonction du temps et de la température

Comme il n'y a pas d'interactions significatives et que les facteurs étudiés apparaissent donc indépendants, il est normal de s'apercevoir que les résultats de cette expérience concordent assez bien avec les résultats obtenus indépendamment pour chaque variable.

Le résultat qui amène la surface de réponse à augmenter constamment jusqu'à la valeur de temps=0 est attribuable à une seule valeur. En effet, un seul échantillon a été pris au temps = 1 heure, et cet échantillon a produit une activité fucosidase assez élevée (0,297), alors que la valeur moyenne au temps de 1,5 heure de 0,168 était beaucoup plus basse que la valeur au temps 1 heure et également plus basse que la valeur à 2 heures (0,184). Devant cette valeur douteuse au temps = 1, il apparaît opportun de refaire l'étude sans ce point pour voir l'influence de ce point sur le modèle.

Les résultats obtenus par l'élimination de la valeur douteuse à t = 1 sont très similaires aux résultats obtenus lorsque la valeur au temps = 1 heure est dans le modèle à l'exception du point optimal. Plutôt qu'un point de selle, on obtient au maximum à : une valeur de température de 11,5°C, une valeur de pH de 5,7, un temps de 0,7 heure et un volume de PNPF de 0,14 et à ce point optimal l'activité fucosidase serait de -0,321

| Facteurs | Valeur critique | | Paramètres |
|---|-----------------|-----------|-------------|
| | Coded | Uncoded | |
| Température | -0.782567 | 11.522997 | Température |
| pH | -0.672966 | 5.654068 | pH |
| Temps | -2.072919 | 0.695311 | Temps |
| Volume | 0.944540 | 0.136672 | Volume |
| Valeur predate au point stationnaire: 0.321194 | | | |

Cette étude de validation montre que l'échantillon pris au temps = 1 heure a une influence majeure sur le point représentant la valeur optimale d'activité fucosidase, ce qui suggère d'approfondir l'information au niveau de l'activité autour d'un temps de 1 heure afin de juger de si la valeur d'activité fucosidase de 0,297 au temps 1 heure est aberrante ou représente bien la réalité.

La figure 17 illustre la surface de réponse temps*température dans le même domaine que la figure précédente utilisant tous les échantillons :

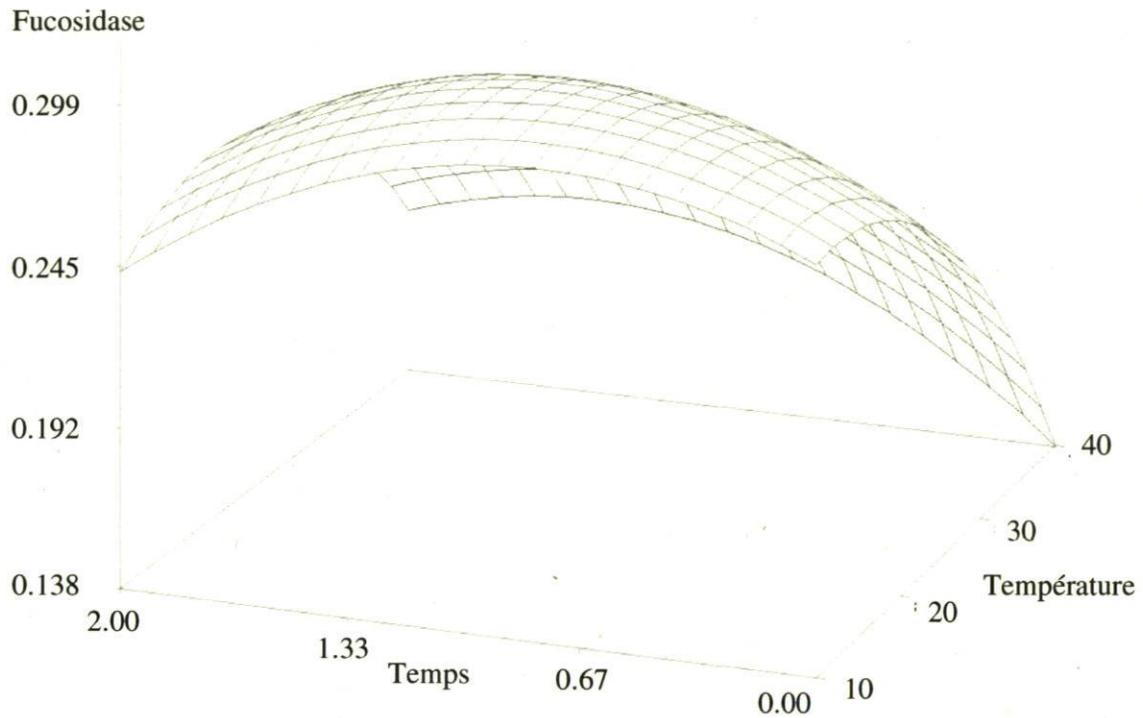


Figure 17- Activité fucosidase en fonction du temps et de la température (sans la valeur douteuse $t = 1$)

Par ailleurs, le test sur le *lack of fit* présenté au tableau 13 permet d'évaluer la variabilité de la mesure pour porter un jugement sur la qualité de l'ajustement obtenu à l'aide du modèle. Dans le cas présent, le test conclut à un 'Lack of fit' significatif. Dans de telles circonstances il est recommandé de compléter l'étude avec des expérimentations supplémentaires du point central avant de conclure avec certitude sur le processus sous-jacent expliquant la variable réponse (activité fucosidase).

Tableau 13- Test sur le lack of fit

| Residuel | DL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F calculé | Pr > F |
|---------------|----|------------------|--------------------|-----------|--------|
| Lack of Fit | 10 | 0.038635 | 0.003864 | 11.03 | 0.0041 |
| Erreur pure | 6 | 0.002101 | 0.000350 | | |
| Erreur totale | 16 | 0.040737 | 0.002546 | | |

Validation sans la valeur douteuse au temps = 1

| Réponse de la variable fucosidase | |
|-----------------------------------|----------|
| Réponse moyenne | 0.162226 |
| Root MSE | 0.050546 |
| R-carré | 0.8250 |
| Coefficient de Variation | 31.1577 |

| Régression | DL | Type I Somme des carrés | R-carré | F calculé | Pr > F |
|----------------|----|-------------------------|---------|-----------|--------|
| Lineaire | 4 | 0.128971 | 0.5890 | 12.62 | 0.0001 |
| Quadratique | 4 | 0.046262 | 0.2113 | 4.53 | 0.0135 |
| Produit croisé | 6 | 0.005402 | 0.0247 | 0.35 | 0.8975 |
| Total Modèle | 14 | 0.180635 | 0.8250 | 5.05 | 0.0018 |

| Résiduel | DL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F calculé | Pr > F |
|---------------|----|------------------|--------------------|-----------|--------|
| Lack of Fit | 9 | 0.036222 | 0.004025 | 11.49 | 0.0038 |
| Erreur pure | 6 | 0.002101 | 0.000350 | | |
| Erreur totale | 15 | 0.038323 | 0.002555 | | |

| Paramètre | DL | Estimation | Erreur standard | Valeur de t | Pr > t | Paramètre estimé |
|-------------------------|----|------------|-----------------|-------------|---------|------------------|
| Intercept | 1 | 0.035730 | 0.731453 | 0.05 | 0.9617 | 0.200825 |
| Température | 1 | 0.005688 | 0.007782 | 0.73 | 0.4761 | -0.122727 |
| pH | 1 | 0.025269 | 0.150664 | 0.17 | 0.8690 | -0.018930 |
| Temps | 1 | 0.013663 | 0.288487 | 0.05 | 0.9629 | -0.043872 |
| Volume | 1 | 2.582889 | 3.940128 | 0.66 | 0.5221 | 0.043422 |
| Température*Température | 1 | -0.000176 | 0.000042631 | -4.14 | 0.0009 | -0.158767 |
| pH*Température | 1 | 0.000244 | 0.000842 | 0.29 | 0.7758 | 0.014656 |
| pH*pH | 1 | -0.004970 | 0.009592 | -0.52 | 0.6119 | -0.019878 |
| Temps*Température | 1 | 0.001420 | 0.001685 | 0.84 | 0.4124 | 0.031959 |
| Temps*pH | 1 | 0.005337 | 0.025273 | 0.21 | 0.8356 | 0.008005 |
| Temps*Temps | 1 | -0.033638 | 0.049941 | -0.67 | 0.5108 | -0.018921 |
| Volume*Température | 1 | -0.029205 | 0.028081 | -1.04 | 0.3148 | -0.052569 |
| Volume*pH | 1 | 0.178548 | 0.421216 | 0.42 | 0.6777 | 0.021426 |
| Volume*Temps | 1 | -0.098234 | 0.842432 | -0.12 | 0.9087 | -0.004421 |
| Volume*Volume | 1 | -11.661388 | 10.657780 | -1.09 | 0.2911 | -0.041981 |

| Facteurs | DL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F calculé | Pr > F | Paramètres |
|-------------|----|------------------|--------------------|-----------|--------|-------------|
| Température | 5 | 0.155283 | 0.031057 | 12.16 | <.0001 | Temperature |
| pH | 5 | 0.004272 | 0.000854 | 0.33 | 0.8842 | pH |
| Temps | 5 | 0.014099 | 0.002820 | 1.10 | 0.3990 | Temps |
| Volume | 5 | 0.018410 | 0.003682 | 1.44 | 0.2663 | Volume |

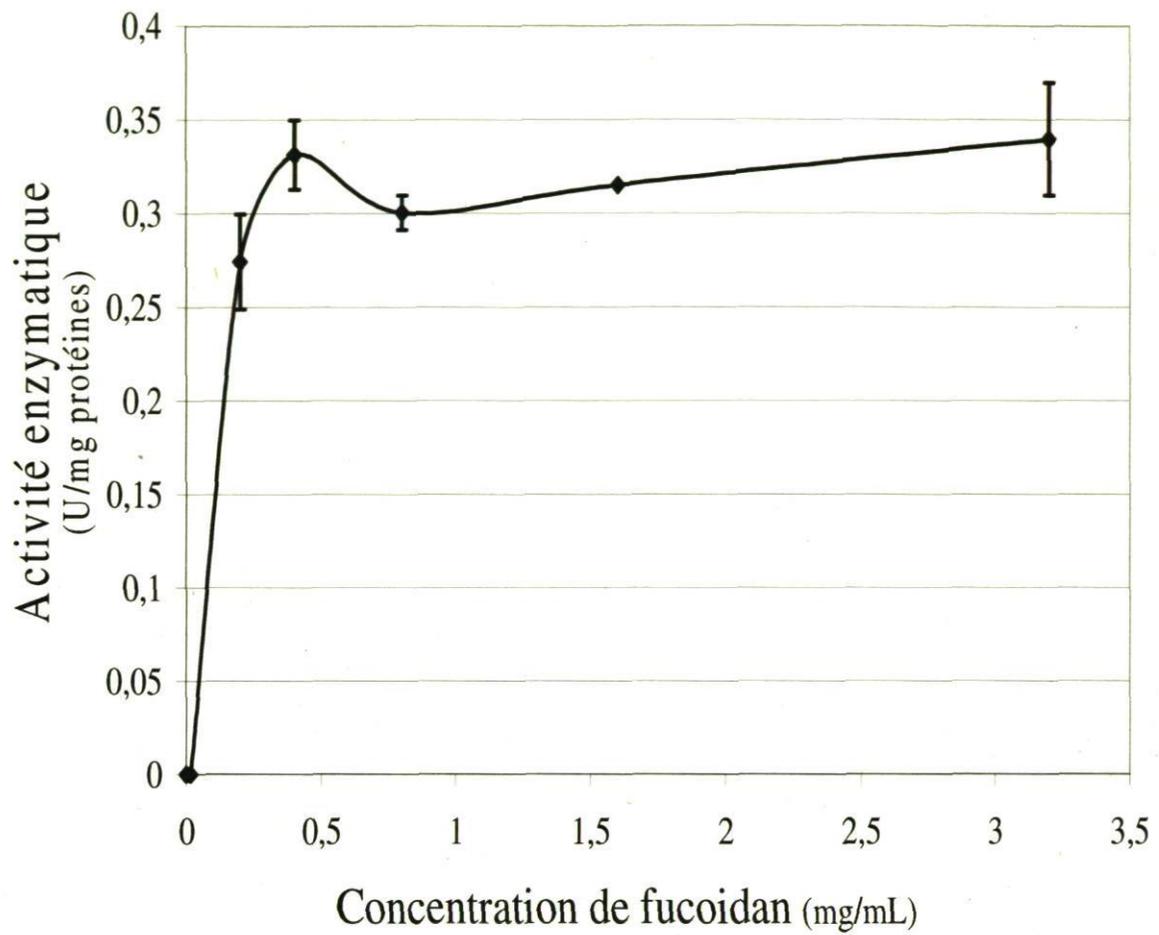
3.4.3 Activité fucoïdane hydrolase

L'activité enzymatique a été observée en fonction de la concentration de substrat utilisé (Figure 18). Une augmentation de l'activité enzymatique avec la quantité de substrat est observée jusqu'à l'obtention d'un plateau à partir de 0,5 mg/mL. L'activité maximale est d'environ 0,32 U/mg de protéines.

L'activité enzymatique a été observée dans le temps (Figure 19). Une augmentation de l'activité fucoïdane hydrolase a été observée après une heure d'incubation, pour atteindre

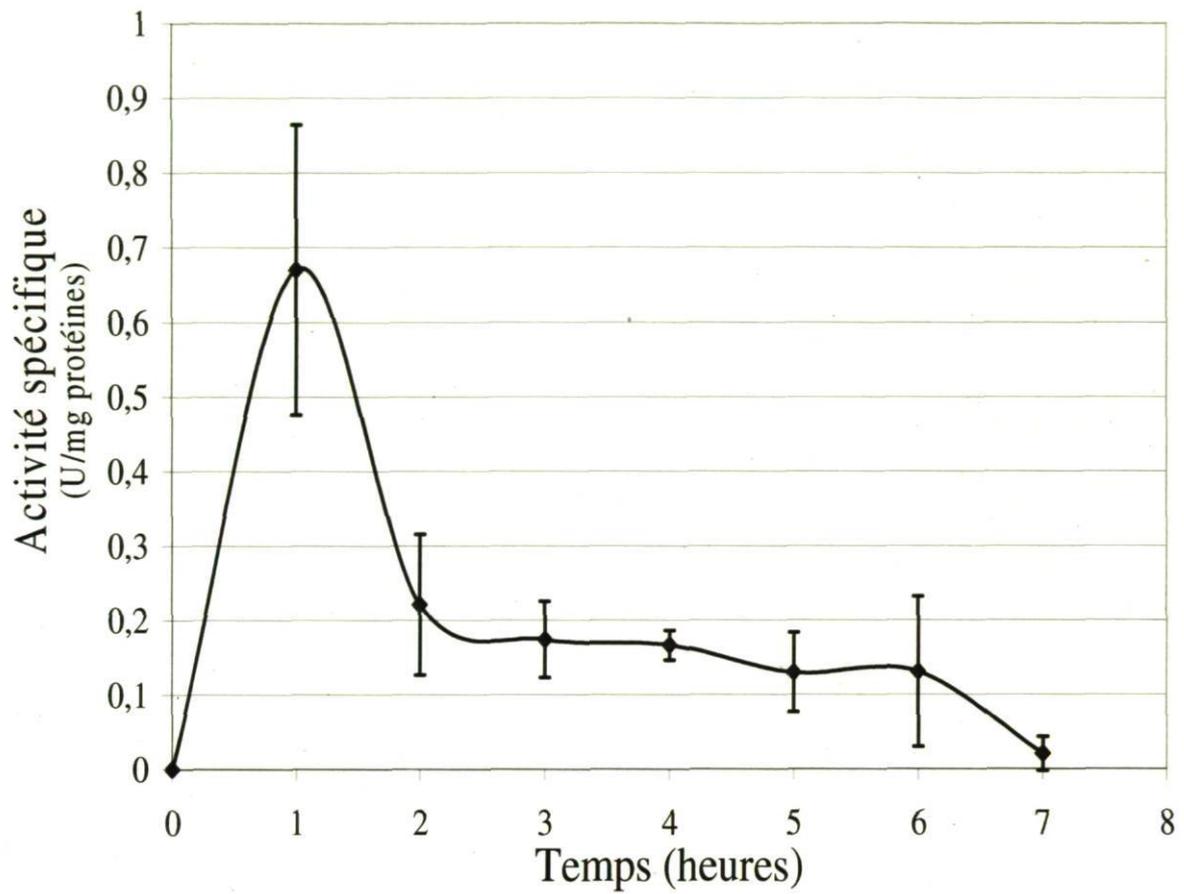
0,670 U/mg de protéines, puis une diminution importante a été notée pour des temps plus longs. L'activité spécifique reste relativement constante dans le temps à partir de 2 heures jusqu'à 6 heures à des valeurs de 0,150 U/mg de protéine, puis diminue après 6 heures.

L'activité enzymatique de la fucoïdane hydrolase a été testée en fonction de la température d'incubation (Figure 20). L'activité spécifique a une tendance à augmenter jusqu'à 50 °C à un niveau de 0,270 U/mg de protéines. Au-delà de cette température, il y a un ralentissement dans l'activité enzymatique. L'effet du pH a été testé (Figure 21). Il y a une augmentation de l'activité avec l'augmentation du pH jusqu'à une activité de 0,350 U/mg.



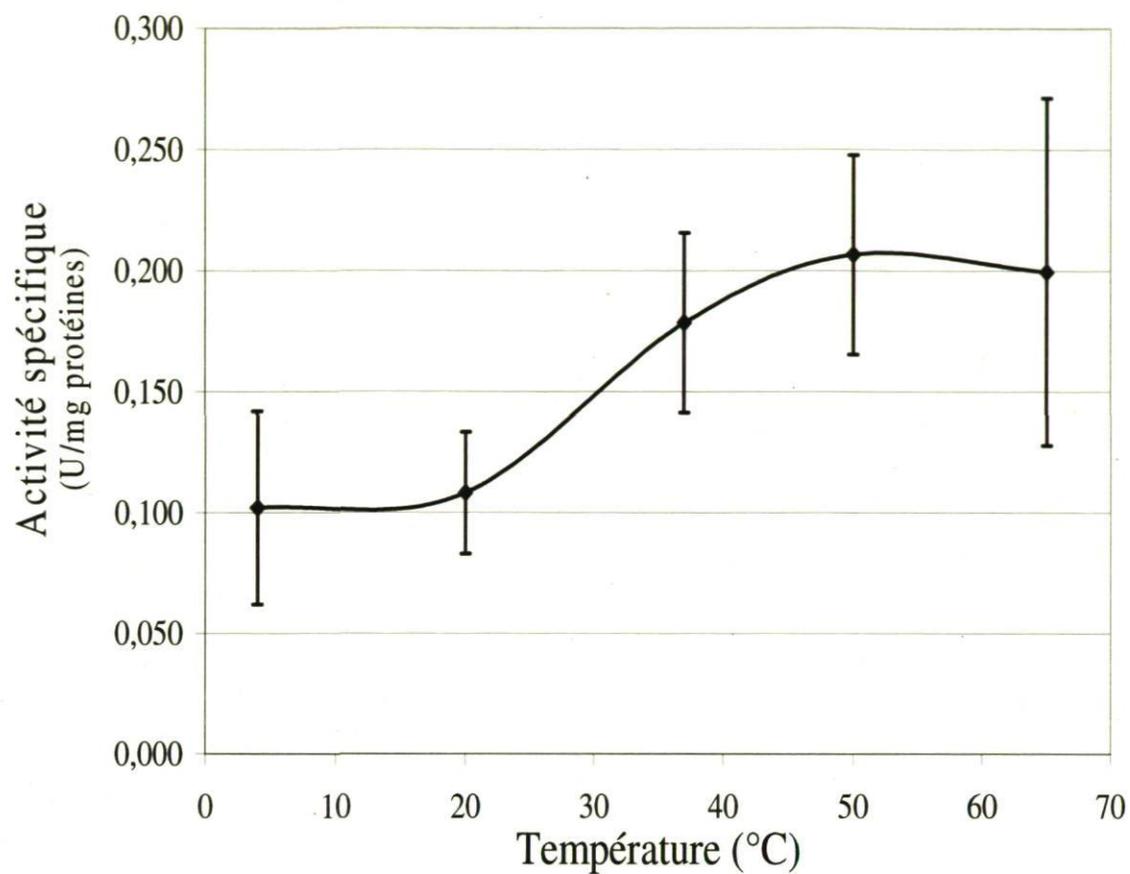
Légende : \pm écart-type

Figure 18- Activité fucoidane hydrolase en fonction de la concentration de substrat



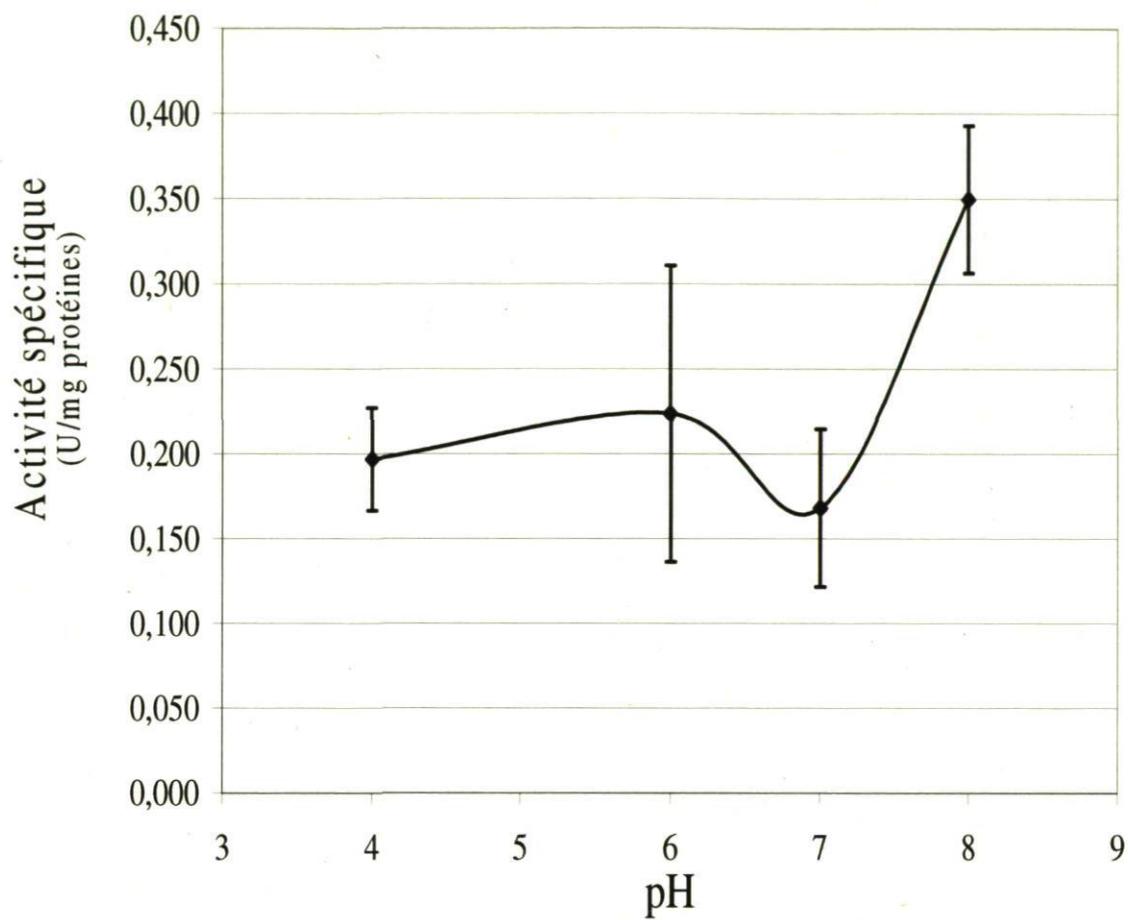
Légende : \pm écart-type

Figure 19- Activité fucoïdane hydrolase en fonction du temps d'incubation



Légende : \pm écart-type

Figure 20- Activité fucoïdane hydrolase en fonction de la température



Légende : \pm écart-type

Figure 21- Activité fucoidane hydrolase en fonction du pH

3.5 Discussion

3.5.1 Activité fucosidase

La bactérie *Pseudoalteromonas* spp. isolée lors de cette étude présente une activité fucosidase et fucoïdane hydrolase. La synthèse de ces deux enzymes au sein d'une même organisme a été uniquement rapportée chez la bactérie *Mariniflexile fucanivorans* et chez des invertébrés marins (Kusaykin et al., 2003, Barbeyron et al., 2008).

L'activité fucosidase de l'extrait protéique de *Pseudoalteromonas* sp. Fuc 3 varie entre 0,001 à 0,023 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine dépendamment des paramètres utilisés. Cette activité est inférieure à celle rapportée pour *P. citrea* extrait à partir du mollusque *Patinopecten yessoensis*. En effet, l'activité fucosidase de *P. citrea* variait entre 0,18 et 3 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéines (Bakunina et al., 2003). Par contre, cette bactérie ne présentait pas d'activité fucoïdane hydrolase contrairement à la bactérie isolée lors de cette étude. De plus, les *P. citrea* extraits des autres habitats ne présentent aucune activité fucosidase. De la même façon, aucune activité fucosidase n'avait été détectée pour *P. issachenkonii* et *nigrifaciens* (Ivanova et al., 2002., 2003). Par ailleurs, les activités fucosidases des bactéries marines *Arenibacter* sont de loin supérieures à celles retrouvées chez *Pseudoalteromonas* spp. En effet, les activités de ces bactéries varient entre 0,1 et 4,6 $\mu\text{mol/min}$ par mg de protéines (Urvantseva et al., 2006).

Les activités fucosidase retrouvées chez les invertébrés marins sont aussi supérieures à celles de *Pseudoalteromonas* spp. L'invertébré marin *Littorina kurila* présente une activité fucosidase de 4,37 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine et *Pecten maximus* a une activité fucosidase variant entre 0,15 et 86 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine (Bertheau et al., 2002 ; Kusaykin et al., 2003).

3.5.1.1 Effet de la température

L'activité fucosidase de *Pseudoalteromonas* spp. augmente avec la température jusqu'à 20 °C puis décroît drastiquement lors que l'incubation est de 5 heures. Par contre, lors du CCD, le temps d'incubation est plus court et il semble donc y avoir un moins grand écart par rapport

aux températures d'incubations. Par contre, chez les invertébrés marins, la température optimale est beaucoup plus élevée. Par exemple, l'activité fucosidase de l'invertébré marin *Pecten maximus* est optimale entre 50 °C et 60 °C (Daniel et al., 1999 ; Berteau et al., 2002).

3.5.1.2 Effet du pH

L'activité de la fucosidase est très peu influencée par le pH à l'exception du pH 3 qui présente une forte activité enzymatique, ce qui est en concordance avec l'activité fucosidase retrouvée chez l'invertébré marin *Haliotis gigantea*. *H. gigantea* présente une forte activité à un pH variant entre 2 à 6 et dont l'activité maximale se trouve entre 2 et 5 (Tanaka et Sorai., 1970). À l'opposé, l'activité de la fucosidase de l'invertébré marin *Littorina kurila* augmente avec le pH jusqu'à un optimum autour de 6 à 7, puis décroît et devient nulle à pH 9 (Kusaykin et al., 2003). Lors de cette étude, l'activité fucosidase de la bactérie *Pseudoalteromonas* spp. demeurait encore active à pH 11. Pour sa part, l'activité fucosidase de *Pecten maximus* était optimale à pH 5 et conservait 50 % de son activité à pH 3 et 5.5 (Daniel et al., 1999 ; Berteau et al., 2002).

3.5.2 Activité fucoïdane hydrolase

L'activité enzymatique spécifique de la fucoïdane hydrolase présente chez *Pseudoalteromonas* sp. varie entre 0,021 à 0,670 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine selon les paramètres utilisés. Cette activité concorde avec la littérature scientifique. En effet, l'étude d'Ivanova et collaborateurs (2002, 2003) avait démontré que la souche *P. issachenkonii* isolée avait une activité fucoïdane hydrolase qui oscillait entre 0,03 et 0,4 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine envers le fucoïdane de *F. evanescens*. Pour sa part, *P. citrea* avait une activité variant entre 0 et 1,92 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine envers le fucoïdane de *F. evanescens* et de 0 à 1,3 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine envers le fucoïdane de *L. cichorioides* dépendamment de l'habitat d'où ont été isolées les différentes souches (Bakunina et al., 2002 ; Ivanova et al., 2003). Par exemple, l'activité de *P. citrea* isolée à partir de l'eau de mer variait entre 0 et 0,3 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéines (Bakunina et al., 2002 ; Ivanova et al., 2003). Pour sa part, l'étude d'Urvantseva et collaborateurs (2006) avait démontré une activité fucoïdane hydrolase pour diverses espèces de *Flavobacteriaceae* qui variaient selon les espèces et l'habitat d'où elles avaient été extraites. Ainsi, les activités respectives de la fucoïdane hydrolase envers *Fucus. evanescens*

et *Laminaria cichorioides* sont de 0,0164 et 0,0205 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéines pour *Zobellia sp.* extrait de l'eau de mer. Des activités variant entre 0,0018 et 0,055 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéines ont été observées chez les espèces *Bizonia sp.*, *Gramella sp.*, *Zobellia sp.*, *Z. laminariae*, *Formosa sp.*, *Salegentibacter sp.*, *Maribacter sp.*, *M. sedimenficola* et *M. ulvicola*, *Winogradskyella examia*, *Algibacter lectus*, *Mesonia algae*, isolées du fond de la mer, de l'invertébré marin *Strongylocentrotus intermedius* et des algues *Laminaria japonica*, *Acrosiphonia sonderi*, *Ulva fenestrata* et *Polysiphonia japonica*. Aucune activité fucoïdane hydrolase contre *F. evanescens* n'avait été détectée pour *P. nigrifaciens* (Ivanova et al., 2003). L'activité de la fucoïdane hydrolase au niveau des bactéries marines est généralement faible et inductible, mais n'est pas rare (Descamps et al., 2006).

Les activités fucoïdane hydrolase retrouvées chez les invertébrés marins sont semblables à celle retrouvée chez la bactérie marine isolée lors de cette étude. En effet, lors de l'étude de Kusaykin et collaborateurs (2003), les activités fucoïdane hydrolase variaient entre 0,002 et 0,235 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine selon les espèces d'invertébrés marins. Les activités fucoïdane hydrolase des différents invertébrés marins isolés lors de l'étude de Burtseva et collaborateurs (2000) variaient entre 0,001 et 0,630 $\mu\text{mol/h}$ par mg de protéine.

3.5.2.1 Effet de la température

L'activité de la fucoïdane hydrolase présente une variabilité importante entre les réplifications, particulièrement à la température de 65°C. Cette variabilité peut être due à une précipitation de certains composés présents dans la solution enzymatique qui fausse la lecture au spectrophotomètre. Par ailleurs, l'activité de la fucoïdane hydrolase de *Pseudoalteromonas spp.* tend à augmenter avec la température, puis décroît au-delà de 50 °C. De la même façon, lors de l'étude de Bakunina et collaborateurs (2002), deux des trois souches de *P. citrea* avaient une activité fucoïdane hydrolase stable jusqu'à 50 °C, puis une perte importante de l'activité survenait au-dessus de cette température. Par contre, une perte totale de l'activité pour ces deux souches était obtenue entre 65 et 70 °C, alors que la souche de *Pseudoalteromonas spp.* isolée lors de cette étude présente encore une activité fucoïdane hydrolase à 65 °C. Enfin, une troisième souche de *P. citrea* présentait une perte d'activité au dessus de 45 °C avec une perte totale d'activité à 60 °C. Lors de l'étude de Sakai et collaborateurs (2004), l'activité de la fucoïdane hydrolase augmentait avec l'accroissement de

température. Cependant, l'optimum de température était obtenu autour de 30 à 35 °C contrairement à la souche isolée lors de cette étude qui présente un optimum autour de 50 °C. De plus, l'activité fucoïdane hydrolase de la souche isolée lors de l'étude de Sakai et collaborateurs décroissait drastiquement au-delà de 35 °C et devenait nulle à 45 °C. Enfin, lors de l'étude de Descamps et collaborateurs (2006), l'optimum de température pour la fucoïdane hydrolase de la souche de *Flavobacteriaceae* était beaucoup plus bas que celui obtenu lors de cette étude. En effet, l'optimum était situé entre 20 et 25 °C.

Au niveau des invertébrés marins, l'activité fucoïdane hydrolase de *L. kurila* isolée lors de l'étude de Kusaykin et collaborateurs (2003) était stable 45 °C, puis devenait nulle à 55 °C.

3.5.2.2 Effet du pH

Pareillement à la température, certaines données de l'activité fucoïdane hydrolase varient énormément entre les réplifications, particulièrement à pH 6. La fucoïdane hydrolase de *Pseudoalteromonas* sp. semble être peu influencée par l'effet du pH, à l'exception du pH 8 qui tend à augmenter son activité. La littérature rapporte que le pH optimal pour l'activité des fucoïdane hydrolase des bactéries marines est à pH neutre (~7). Ainsi, lors de l'étude de Sakai et collaborateurs (2004), l'optimum de pH pour la fucoïdane hydrolase était situé entre 6 et 8 et devenait nul en bas de pH 5. L'activité fucoïdane hydrolase de *P. atlantica* augmentait avec le pH jusqu'à un optimum à pH 7, puis décroissait après ce pH (Yaphe et Morgan., 1959). L'activité fucoïdane de la souche SW5 isolée lors de l'étude de Descamps et collaborateurs (2006) était optimale à pH 7.5. De la même façon, lors de l'étude de Bakunina et collaborateurs (2002), l'activité fucoïdane hydrolase de *P. citrea* était très fortement dépendante du pH. Ainsi, en dessous de pH 5 et au-dessus de pH 8, l'activité fucoïdane hydrolase était fortement réduite, voir même nulle chez certaines souches. Le pH optimal de la fucoïdane hydrolase de *P. citrea* était situé entre 6,5 et 7. Par contre, lors de cette même étude, deux des trois souches présentaient deux pics d'activité, ce qui pourrait démontrer la présence de différentes formes moléculaires pour la fucoïdane hydrolase ou de deux enzymes. De la même façon, lors de l'étude de Kusaykin et collaborateurs (2003), la fucoïdane hydrolase isolée de l'invertébré marin *L. kurila* présentait deux pics d'activité, un à pH 5.4 et un à pH 8,5 ce qui tend à confirmer que l'enzyme peut être présente sous différentes formes.

Au niveau des invertébrés marins, les fucoïdane hydrolases sont plus généralement plus actives à pH légèrement acide (~4,5 à 5,4) (Kusaykin et al., 2003).

3.6 Conclusion

L'activité de la fucosidase varie selon la quantité de substrat utilisée jusqu'à un maximum de 0,009 U/mg à 0,08 mL de PNPf utilisé. La température de 20°C est la température optimale pour l'activité fucosidase. Le pH et le temps semblent par contre avoir très peu d'effet sur l'activité fucosidase. Une comparaison avec une enzyme commerciale aurait été pertinente pour vérifier que la procédure était adéquate. L'activité fucoïdan hydrolase tend à augmenter avec la température jusqu'à 50°C puis décroît au-delà de cette température. Une augmentation de l'activité est observée à pH 8. Le temps semble avoir très peu d'effet sur l'activité de la fucoïdan hydrolase sauf pour une heure d'incubation où l'activité est maximale puis décroît de façon importante après ce temps. Cette étude a donc démontré que la souche de *Pseudoalteromonas* isolée synthétise les enzymes fucosidase et fucoïdan hydrolase. Il serait intéressant de voir si ces enzymes ont aussi un effet sur d'autres sortes de fucoïdane que celui utilisé lors de cette étude ou si l'activité enzymatique est dépendante de la structure du fucoïdane.

Chapitre 4

Conclusion

4. Conclusion

Cette étude montre que la souche de *Pseudoalteromonas* spp. isolée à partir de l'eau de mer est en mesure de produire l' α -L-fucosidase et la fucoïdane hydrolase. La présence de ces enzymes chez *Pseudoalteromonas* est en accord avec la littérature. Cependant, aucune différence au niveau de la croissance de la souche n'a été observée à la suite de l'utilisation des différents sucres composant le fucoïdane. Ceci peut être expliqué par la capacité de *Pseudoalteromonas* à croître dans des milieux très pauvres par ajustement de ses voies métaboliques. Par ailleurs, l'activité fucosidase des extraits de *Pseudoalteromonas* spp. est très fortement dépendante de la température. Ainsi, les conditions optimales pour l'activité fucosidase sont obtenues à une température de 21,6°C, à pH 6,6, pour un temps de 1,2 heure d'incubation et un volume de 0,1 mL de PNPF. Cette température présente l'avantage industriel de limiter les coûts économiques engendrés par l'utilisation et l'installation d'un système de chauffage ou de refroidissement. Par ailleurs, la température optimale pour l'activité fucosidase est aussi une température optimale pour la croissance de la souche, puisque la souche est psychrotrophe. Enfin, cette température limite la croissance de bactéries pathogènes qui pourraient possiblement contaminer les cuves d'incubation industrielles.

L'originalité de l'étude repose sur l'utilisation d'un milieu chromogénique pour la sélection des souches capables d'hydrolyser le fucoïdane. Par ailleurs, aucune étude antérieure n'avait démontré la présence simultanée des deux enzymes hydrolysant le fucoïdane au sein d'une même bactérie. De plus, *Pseudoalteromonas* spp. est la première bactérie isolée du fleuve St-Laurent à présenter une activité hydrolytique envers le fucoïdane.

Au niveau industriel, l'utilisation d'enzymes bactériennes permettrait de mieux contrôler la synthèse des oligosaccharides à partir des fucoïdanes, de caractériser les fucoïdanes, d'amplifier leurs activités biologiques et d'éviter l'utilisation de produits chimiques pour produire les biomolécules actives. L'hydrolyse enzymatique plutôt que chimique permet aussi de rassurer les consommateurs qui recherchent des produits les plus naturels possible. Cependant, puisque l'activité de la fucoïdane hydrolase est spécifique à la structure unique de chaque fucoïdane, l'utilisation du fucoïdane commercial ne permet pas de démontrer hors de tout doute que cette enzyme serait active sur les fucoïdanes de *Saccharina longicuris*. Des études subséquentes doivent donc être faites pour vérifier l'activité de cette enzyme sur les fucoïdanes des algues du St-Laurent.

Par ailleurs, certaines études ont démontré que l'expression de certains gènes au sein d'une même espèce peut être dépendante de la pression environnementale. Par conséquent, différents milieux de culture pourraient être testés pour la stimulation des activités fucosidases et fucoïdane hydrolase chez *Pseudoalteromonas* sp. Par ailleurs, le gène codant pour ces deux enzymes pourront être isolés et permettre l'obtention d'un transformant capable d'hydrolyser les fucoïdanes dans le but de développer un processus de bioconversion et ainsi permettre la commercialisation de fraction de polysaccharides ayant des caractéristiques biologiques spécifiques.

Liste des références citées

- Adhikari, U., Mateu, C.G., Chattopadhyay, K., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Ray, B., (2006). Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry* **67**, 2474-2482
- Ajisaka, K., Agawa, S., Nagumo, S., Kurato, K., Yokoyama, T., Arai, K., Miyazaki, T., (2009). Evaluation and comparison of the antioxidative potency of various carbohydrates using different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 3102-3107
- Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., Kizaki, M., (2005). Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of capsase-3 and down regulation of ERK pathways. *American Journal of Hematology* **78**, 7-14
- Albuquerque, I.R.L., Queiroz, K.C.S., Alves, L.G., Santos, E.A., Leite, E.L., Rocha, H.A.O., (2004). Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. *Brazilian journal of medical and biological research* **37** (2), 167-171
- Alekseyenko, T.V., Zhanayeva, S.Y., Venediktova, A.A., Zvyagintseva, T.N., Kuznetsova, T.A., Besednova, T.N., Korolenko, T.A., (2007). Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk sea *Fucus evanescens* brown alga. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **143**(6), 675-677
- Alexeeva, Y.V., Ivanova, E.P., Bakunina, I.Y., Zvyagintseva, T.N., Mikhailov, V.V., (2002). Optimization of glycosidases production by *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM3549. *Letters in Applied Microbiology* **35**, 343-346
- Alkhatib, B., Freguin-Bouilland, C., Lallemand, F., Henry, J.P., Litzler, P.Y, Marie, J.P. Richard, V., Thuillez, C., Plissonier, D., (2006). Low molecular weight fucan prevents transplant coronaropathy in rat cardiac allograft model. *Transplant Immunology* **16**, 14-19
- Alves, A.P., Mulloy, B., Diniz, J.A., Mourao, P.A.S. (1997). Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 6965-6971
- Alves, A.P., Mulloy, B., Moy, G.W., Vacquier, V.D., Mourao, P.A.S., (1998). Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structure of their egg jelly sulfated fucans. *Glycobiology* **8**, 939-946
- Andrei, G., De Clercq, E., (1990) Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication in vitro. *Antiviral Research* **14**, 287-300

- Angstwurm, K., Weber, J.R., Segert, A., Bürger, W., Weih, M., Freyer, D., Einhäupl, K.M., Dirnagl, U., (1995). Fucoidin a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. *Neuroscience Letters* **191**, 1-4
- Angulo, Y., Lomonte, B., (2003). Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A2. *Biochemical Pharmacology* **66**, 1993-2000
- Anno, K., Terahata, H., Hayashi, Y., Seno, N., (1966). Isolation and purification of fucoidin from brown seaweed *Pelvetia wrightii*. *Agricultural and Biology Chemistry* **30**, 495-499
- Azofeifa, K., Angulo, Y., Lomonte, B., (2009). Ability of fucoidan to prevent muscle necrosis induced by snake venom myotoxins : Comparison of high and low molecular weight fractions. *Toxicon* **51**, 373-380
- Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R., De Clercq, R., (1988). Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy* **32** (11), 1742-1745
- Bachelet, L., Bertholon, I., Lavigne, D., Jandrot-Perrus, M., Chaubet, F., Letourneur, D., (2009). Affinity of low molecular weight fucoidan for p-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochimica & Biophysica Acta* **1790**, 141-146
- Bakunina, I.Y., Nedashkovskaya, O.I., Alekseeva, S.A., Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Gorshkova, N.M., Isakov, V.V., Zvyagintseva, T.N., Mikhailov, V.V., (2002). Degradation of fucoidan by marine proteobacterium *Pseudoalteromonas citrea*. *Microbiology* **71** (1), 41-47
- Barbeyron, T., L'Haridon, S., Michel, G., Czjzek, M., (2008). *Mariniflexile fucanivorans* sp. nov., a marine member of the flavobacteriaceae that degrades sulphated fucans from brown algae. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **58**, 2107-2113
- Barreto, A.R.F., Cavalcante, I.C., Castro, M.V., Junqueira, A.F.T.A.m Vale, M.R., Ribeiro, R.A., Souze, M.H.L.P., Brito, G.A.C., (2008). Fucoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A induced Ileal enteritis in mice. *Digestive Disease Sciences* **53**, 990-996
- Barroso, E.M.A., Costa, L.S., Medeiros, V.P., Cordeiro, S.L., Costa, M.S.S.P., Franco, C.R.C., Nader, H.B., Leite, E.L., Rocha, H.A.O., (2008). A non-anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity *in vivo*. *Planta medica* **74**, 712-718
- Becker, C.F., Guimaraes, J.A., Mourao, P.A.S., Verli, H., (2007). Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions : implications to their anticoagulant activities. *Journal of Molecular Graphics and Modeling* **26**(1), 391-399

- Béress, A., Wassermann, O., Ruhn, T., Kraiselburd, E., Gonwez, L.V., DeMoita, G.E., Chaw, P.I., (1993). A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Natural Products* **56** (4), 478-488
- Berteau, O. McCort, I., Gouasdoué, N., Tissot, B., Daniel, R., (2002). Characterization of a new α -L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyses the hydrolysis of α -L-fucose from algal fucoidan *Ascophyllum nodosum*. *Glycobiology* **12**(4), 273-282
- Berteau, O., Mulloy, B., (2003). Review: sulfated fucans, fresh perspectives : structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **13** (6), 29-40
- Bilan, M.I., Grachev, A.A. Ustuzhanina, N.E., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., Usov, A.I., (2002). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *fucus evanescens* CAg. *Carbohydrate Research* **337**, 719-730
- Bilan, M.I., Grachev, A.A., Ustuzhanina, N.E., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., Usov, A.I., (2004). A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. *Carbohydrate Research* **339**, 511-517
- Bilan, M.I., Kusaykin, M.I., Grachev, A.A., Tsvtkova, E.A., Zvyagintseva, T.N., Nifantiev, N.E., Usov, A.I., (2005). Effect of enzyme preparation from the marine mollusk *Littorina kurila* on fucoidan from the brown alga *Fucus distichus*. *Biochemistry* **70** (12), 1321-1326
- Bilan, M.I., Grachev, A.A., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., Usov, A.I., (2006). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydrate Research* **341**, 238-245
- Bilan, M.I., Zakharova, A.N., Grachev, A.A., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., Usov, A.I., (2007). Polysaccharide of algae :60. Fucoidan from the pacific brown alga *Anelopus japonicus* (Harv.)Winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae). *Russian Journal of Bioorganic chemistry* **33** (1), 44-53
- Bilan, M.I., Vinogradova, E.V., Tsvetkova, E.A., Grachev, A.A., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., Usov, A.I., (2008). A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*. *Carbohydrate Research* **343**, 2605-2612
- Black., W.A.P., (1954). The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British laminariaceae and fucaceae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **5**, 445-448

- Blondin, C., Fischer, E., Boisson-Vidal, C., Kazatchkine, M.D., Jozefonvicz, J., (1994). Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. *Molecular Immunology* **31**(4), 247-253
- Blondin, C., Chaubet, F., Nardella, A., Sinquin, C., Jozefonvicz, J., (1996). Relationships between chemical characteristics and anticomplementary activity of fucans. *Biomaterials* **17**, 597-603
- Boettger-Tong, H., Aarons, D., Biegler, B., Lee, T., Poirier, G.R., (1992). Competition between zonae pellucidae and proteinase inhibitor for sperm binding. *Biology of Reproduction* **47**, 716-722
- Boisson-Vidal, C., Zemani, F., Caligiuri, G., Galy-Fauroux, I., Collic-Jouault, S., Helley, D., Fischer, A.M., (2007). Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells : Effect of fucoidan from Marine Algae. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* **5**, 67-77
- Boldt, J., Howe, A.H., Parkerson, J.B., Gunter, L.E., Kuehn, E., (1989). Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. *Biology of Reproduction* **40**, 887-896
- Bork, S., Yokoyama, N., Hashiba, S., Nakamura, K., Takabatake, N., Okamura, M., Ikehara, Y., Igarashi, I., (2007). Asexual growth of *Babesia bovis* is inhibited by specific sulfated glycoconjugates. *Journal of Parasitology* **93** (6), 1501-1504
- Bowman, J.P. (1998). *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. *International Journal of Systemic Bacteriology* **48**, 1037-1041
- Bozal, N., Tudela, E., Rosselo-Mora, R., Lalucat, J., Guinea, J., (1997). *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from antarctic coastal environment. *International Journal of Systemic Bacteriology* **47** (2), 345-351
- Burtseva, Y.V., Kusaikin, M.I., Sova, V.V., Shevchenko, N.M., Skobun, A.S., Zvyagintseva, T.N., (2000). Distribution of fucoidan hydrolases and some glycosidases among marine invertebrates. *Russian Journal of Marine Biology* **26** (6), 453-456
- Byon, Y.Y., Kim, M.Y., Yoo, E.S., Hwang, K.K., Jee, Y., Shin, T., Joo, H.G., (2008). Radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cells: improvement of the cell survival and immunoreactivity. *Journal of Veterinary Science* **9** (4), 359-365
- Cetin, C., Kose, A.A., Aral, E., Çolak, O., Erçel, C., Karabagli, Y., Özyilmaz, M., Alatas, O. Eker, A., (2001). Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury : experimental study in rat epigastric island flaps. *Annals of Plastic Surgery* **47** (5), 540-546

- Chabut, D., Fischer, A.M., Collic-Jouault, S., Laurendeau, I., Matou, S., Le Bonniec, B., Helley, D., (2003). Low molecular weight fucoidan and heparin enhance the basic fibroblast growth factor-induced tube formation of endothelial cells through heparan sulfate-dependent $\alpha 6$ overexpression. *Molecular Pharmacology* **64** (3), 696-702
- Chandia, N.P., Matsuhiro, B., (2008). Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **42**, 235-240
- Charreau, B., Blondin, C., Boisson-Vidal, C., Anegon, I., (1997). Efficiency of fucans in protecting porcine endothelial cells against complement activation and lysis by human serum. *Transplantation Proceedings* **29**, 889-890
- Chaubet, F., Chevelot, L., Jozefonvich, J., Durand, P., Boisson-Vidal, C., (2000). Bioactive Carbohydrate Polymers, Paulsen, B.S., Ed., Amsterdam : Kluwer Academic, 59-84
- Chen, J.H., Lim, J.D., Sohn, E.H., Choi, Y.S., Han, E.T., (2009). Growth inhibitory effect of a fucoidan from brown seaweed *Undaria pinnatifida* on *Plasmodium* parasites. *Parasitology Research* **104**, 245-250
- Chizhov, A.O., Dell, A., Morris, H.R., Haslam, S.M., McDowell, R.A., Shashkov, A.S., Nifant'ev, N.E., Khatuntseva, E.A., Usov, A.I., (1999). A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research* **320**, 108-119
- Choi, E.M., Kim, A.J., Kim, Y.O., Hwang, J.K., (2005). Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *In Vitro*. *Journal of Medicinal Food* **8** (4), 446-453
- Choi, J.I., Kim, H.J., Kim, J.H., Byun, M.W., Chun, B.S., Ahn, D.H., Hwang, Y.J., Kim, D.J., Kim, G.H., Lee, J.W., (2009). Application of gamma irradiation for the enhanced physiological properties of polysaccharides from seaweeds. *Applied Radiation and Isotopes* **67** (7-8), 1277-1281
- Church, F.C., Meade, J.B., Treanor, R.E., Whinna, H., (1989). Antithrombotic activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III and thrombin, 1989. *Journal of Biological Chemistry* **264** (6), 3618-3623
- Collic, S., Fischer, A.M., Tapon-Bretonnière, J., Boisson, C., Durand, P., Jozefonvicz, J., (1991). Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thrombosis Research* **64**, 143-154
- Colin, S., Deniaud, E., Jam, M., Descamps, V., Chevotot, Y., Kervarec, N., Yvin, J.C., Barbeyron, T., Michel, G., Kloareg, B., (2006). Cloning and biochemical characterization of the fucanase FCNA definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology* **16** (11), 1021-1032

- Cooper, R., Dragar, C., Elliot, K., Fitton, J.H., Godwin, J., Thompson, K., (2002). GFS, a preparation of Tasmanian *Undaria pinnatifida* is associated with healing and inhibition of reactivation of herpes. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2** (11), 1-7
- Crance, J.M., Gratier, D., Guimet, J., Jouan, A., (1997). Inhibition of sandfly fever sicilian virus (Phlebovirus) replication *in vitro* by antiviral compounds. *Research Virology* **148**, 353-365
- Cumashi, A., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., D'Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G.E., Berman, A.E., Bilan, M.I., Usov, A.I., Ustyuzhanina, N.E., Grachev, A.A., Sanderson, C.J., Kelly, M., Rabinovich, G.A., Iacobelli, S., Nifantiev, N.E., (2007). A comparative study of antiinflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **17** (5), 541-552
- Damonte, E.B., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S., (2004). Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Current Medicinal Chemistry* **11**, 2399-2419
- Daniel, R., Berteau, O., Jozefonvicz, J., Goasdoue, N., (1999). Degradation of algal *Ascophyllum nodosum* fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusc *Pecten maximus*. *Carbohydrate Research* **322**, 291-297
- Daniel, R., Berteau, O., Chevelot, L., Varenne, A., Gareil, P., Goasdoue, N., (2001). Regioselective desulfatation of sulfated L-fucopyranoside by a new sulfoesterase from the marine mollush *Pecten maximus* : application to the structural study of algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*). *European Journal of Biochemistry* **268**, 5617-5628
- Descamps, V., Colin, S., Lahaye, M., Jam, M., Richard, C., Potin, P., Barbeyron, T., Yvin, J.C., Kloareg, B., (2006). Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae. *Marine Biotechnology* **8**, 27-39
- 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., (2007). Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **22**, 1604-1609
- Deux, J.F., Meddahi-Pellé, A., Bree, F., Bataille, I., Michel, J.B., Letourneur, D., (2009). Comparative studies on the mechanisms of action of four polysaccharides on arterial restenosis. *Journal of Biomaterials Science* **20**, 689-702
- Doh-Ura, K., Kuge, T., Uomoto, M., Nishizawa, K., Kawasaki, Y., Iha, M., (2007). Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51** (6), 2274-2277

- Dravland, J.E., Mortimer, D., (1988) Role for fucose-sulfate-rich carbohydrates in the penetration of zona-pellucida-free hamster eggs by hamster spermatozoa. *Gamete Research* **21**, 353-358
- Duarte, M.E.R., Cardoso, M.A., Nosedá, M.D., Cerezo, A.S., (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research* **333**, 281-293
- Duarte, M.E.R., Cauduro, J.P., Nosedá, D.G., Nosedá, M.D., Gonçalves, A.G., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Cerezo, A.S., (2004). The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity of agaran. *Carbohydrate Research* **339**, 335-347
- Eberspaecher, U., Gerwien, J., Habenicht, U.A.F., Schleuning, W.D., Donner, P., (1991). Activation and subsequent degradation of proacrosin is mediated by zona pellucida glycoproteins, negatively charged polysaccharides, and DNA. *Molecular Reproduction and Development* **30**, 164-170
- Egan, S., Holmstrom, C., Kjelleberg, S., (2001). *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1499-1504
- Ekborg, N.A., Gonzalez, J.M., Howard, M.B., Taylor, L.E., Hutcheson, S.W., Weiner, R.M., (2005). *Saccharophagus degradans* gen nov sp nov a versatile marine degrader of complex polysaccharides. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1545-1549
- Furukawa, S.I., Fujikawa, T., Koga, D., Ide, A., (1992). Purification and some properties of exo-type fucoidanase from *Vibrio* sp. N-5. *Biotechnology & Biochemistry* **56**, 1829-1834
- Furukawa, S.I., Fujikawa, T., Koga, D., Ide, A., (1992). Production of fucoidan-degrading enzymes, fucoidanase and fucoidan sulfatase by *Vibrio* sp. N-5. *Nippon Suisan Gakk* **58**, 1499-1503
- Garcia-Villalon, D., Gil-Fernandez, C., (1991). Antiviral activity of sulfated polysaccharides against African swine fever virus. *Antiviral Research* **15**, 139-148
- Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R., (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *International Journal of Systemic Bacteriology* **45** (4), 755-761

- Gideon, P. et Rengasamy, R., (2008). Toxicological Evaluation of Fucoïdan from *Cladosiphon okamuranus*. *Journal of Medicinal Food* **11**(4), 628-642
- Granert, C., Raud, J., Xie, X., Lindquist, L., Lindbom, L., (1993). Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *The American Society for Clinical Investigation*, 929-936
- Granert, C., Raud, J., Lindquist, L., (1998). The polysaccharide fucoidin inhibits the antibiotic-induced inflammatory cascade in experimental pneumococcal meningitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **5** (3), 322-324
- Granert, C., Raud, J., Waage, A., Lindquist, L., (1999). Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit. *Infection and Immunity* **67** (5), 2071-2074
- Grauffel, V., Kloareg, B., Mabeau, S., Durand, P., Jozefonvicz, J., (1989). New natural polysaccharides with potent antithrombic activity : fucans from brown algae. *Biomaterials* **10**, 363-368
- Hayashi, S., Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., (2007). Fucoïdan partly prevents CCl₄ induced liver fibrosis. *European Journal of Pharmacology* **580**, 380-384
- Hayashi, S., Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., (2008). Defensive effects of a fucoïdan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. *International Immunopharmacology* **8**, 109-116
- Hayakawa, K., Nagamine, T., (2009). Effect of fucoïdan on the biotinidase kinetics in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research* **29**, 1211-1218
- Head, I.M., Sauders, J.R., Pickup, R.W., (1998). microbial evolution, diversity, and ecology : a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated. 1998. *Microbial Ecology* **35**, 1-21
- Hidari, K.I.P.J., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K., Suzuki, T., (2008). Structure and anti dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **376**, 91-95
- Hirayasu, H., Yoshikawa, Y., Tsuzuki, S., Fushiki, T., (2005). sulfated polysaccharides derived from dietary seaweeds increase the esterase activity of a lymphocyte trypsin, granzyme A. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **51**, 475-477
- Holkamp, A.D., Kelly, S., Ulber, R., Lang, S., (2009). Fucoïdins and fucoïdanases-focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**, 1-11

- Holmstrom, C., James, S., Neilan, B.A., White, D.C., Kjelleberg, S., (1998). *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *International Journal of Systemic Bacteriology* **48**, 1205-1212
- Huang, T.T.F., Yanagimachi, R., (1984). Fucoidin inhibits attachment of guinea pig spermatozoa to the zona pellucida through binding to the inner acrosomal membrane and equatorial domains. *Experimental Cell Research* **153**, 363-373
- Hussein, M.M., Abdel, A., Salem., H.M., (1980). Some structural features of a new sulfated heteropolysaccharide from *Padina pavoia*. *Phytochemistry* **19**, 2133-2135
- Hussein, M.M., Abdel, A., Salem, H.M., (1980). Sulfated heteropolysaccharides from *Padina pavoia*. *Phytochemistry* **19**, 2131-2132
- Iqbal, M., Flick-Smith, H., McCauley, J.W., (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E^{ms} with cell surface glycosaminoglycans. *Journal of General Virology* **81**, 451-459
- Irhimeh, M.R., Fitton, J.H., Lowenthal, R.M., (2007). Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Experimental Hematology* **35**, 989-994
- Irhimeh, M.R., Fitton, J.H., Lowenthal, R.M., Kongtawelert, P., (2005). A quantitative method to detect fucoidan in human plasma using a novel antibody. *Methods and Finding in Experimental & Clinical Pharmacology* **27** (10), 705-710
- Isnansetyo, A., Kamei, Y., (2003). *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov., a novel marine bacterium that produces phenolic anti-methicillin-resistant staphylococcus aureus substances. *International Journal of systemic and Evolutionary Microbiology* **53**, 585-588
- Ivanova, E.P., Kiprianova, E.A., Mikhailov, V.V., Levanova, G.F., Garagulya A.D., Gorshkova, N.M., Vysotskii, M.V., Nicolau, D.V., Yumoto, N., Taguchi, T., Toshikawa, S., (1998). Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **48**, 247-256
- Ivanova, E.P., Chun, J., Romanenko, L.A., Matte, M.E., Mikhailov, V.V., Frolova, G.M., Huq, A., Colwell, R.R., (2000). Reclassification of *Alteromonas distincta* Romanenko et al. 1995 as *Pseudoalteromonas distincta* comb. nov. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **50**, 141-144
- Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Matté, M.H., Matté, G.R., Lysenko, A.M., Simidu, U., Kita-Tsakamoto, K., Sawabe, T., Vysotskii, M.V., Frolova, G.M., Mikhailov, V., Christen, R., Colwell, R.R., (2001). Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as

Pseudoalteromonas tetraodonis comb. nov. and emendation of description. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1071-1078

Ivanova, E.P., Sawabe, T., Alexeeva, Y.V., Lysenko A.M., Gorshkova, N.M., Hayashi, K., Zukova, N.V., Christen, R., Mikhailov, V.V., (2002). *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov. a bacterium that degrades the thallus of the brown alga *Fucus evanescens*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **52**, 229-234

Ivanova, E.P., Sawabe, T., Lysenko, A.M., Gorshkova, N.M., Svetashev, V.I., Nicolau, D.V., Yumoto, N., Taguchi, T., Yoshikawa, S., Christen, R., Mikhailov, V.V., (2002). *Pseudoalteromonas ruthenica* sp. nov., isolated from marine invertebrates. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **52**, 235-240

Ivanova, E.P., Bakunina, I.Y., Sawabe, T., Hayashi, K., Alexeeva, Y.V., Zhukova, N.V., Nicolau, D.V., Zvaygintseva, T.N., Mikhailov, V.V., (2002). Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus evanescens*. *Microbial Ecology* **43**, 242-249

Ivanova, E.P., Sawabe, T., Lysenko, A.M., Gorshkova, N.M. Hayashi, K., Zhukova, N. V., Nicolau, D.V., Christen, R., Mikhailov, V.V., (2002). *Pseudoalteromonas translucida* sp. nov. and *Pseudolateromonas paragorgicola* sp. nov., and emended description of the genus. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1759-1766

Ivanova, E.P., Shevchenko, L.S., Sawabe, T., Lysenko, A.M., Svetashev, V.I, Gorshkova, N.M., Satomi, M., Christen, R., Mikhailov, V.V., (2002). *Pseudoalteromonas maricaloris* sp. nov., isolated from an australian sponge, and reclassification of *Pseudoalteromonas aurantia* NCIMB 2033 as *Pseudoalteromonas flavipulchra*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **52**, 263-271

Ivanova, E.P., Bakunina, I.Y., Nedashkovskaya, O.I., Gorshkova, N.M., Alexeeva, Y.V., Zelepuga, E.A., Zvaygintseva, T.N., Nicolau, D.V., Mikhailov, V.V., (2003). Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species *P.citrea*, *P.issachenkonii* and *P.nigrifaciens*. *Current Microbiology* **46**, 6-10

Ivanova, E.P., Gorshkova, N.M., Zhukova, N.V., Lysenko, A.M., Zelepuga, E.A., Prokof'eva, N.G., Mikhailov, V.V., Nicolau, D.V., Christen, R., (2004). Characterization of *Pseudoalteromonas distincta*-like sea-water isolates and description of *Pseudoalteromonas aliena* sp. nov. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1431-1437

- Jhamandas, J.H., Wie, M.B., Harris, K., MacTavish, D., Kar, S., (2005). Fucoidan inhibits cellular and neurotoxic effects of β -amyloid (A β) in rat cholinergic basal forebrain neurons. *European Journal of Neuroscience* **21**, 2649-2659
- Jones, R., (1991). Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulfated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Development* **111**, 1155-1163
- Jones, R., Williams, R.M., (1990). Identification of zona and fucoidan binding proteins in guinea pig spermatozoa and mechanism of recognition. *Development* **109**, 41-50
- Jones, R., (1990). Unusual fucoidin binding properties of chymotrypsinogen and trypsinogen. *Biochemica & Biophysica Acta* **1037**, 227-232
- Kariya, Y., Mulloy, B., Imai, K., Tominaga, A., Kaneko, T., Asari, A., Suzuki, K., Masuda, H., Kyogashima, M. Ishii, T., (2004). Isolation and partial characterisation of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis. *Carbohydrate Research* **339**, 1339-1346
- Kang, K.S., Kim, I.D., Kwon, R.H., Lee, J.Y., Kang, J.S., Ha, B.J., (2008). The effects of fucoidan extracts on CCl₄-induced liver injury. *Archives of Pharmacal Research* **31** (5) 622-627
- Kawano, N., Egashira, Y., Sanada, H., (2007). Effect of dietary fiber in edible seaweeds on the development of D-galactosamine induced hepatopathy in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **53**, 446-450
- Kim, M.H., Joo, H.G., (2007). Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology Letters* **115**, 138-143
- Kim, M.J., Chang, U.J., Lee, J.S., (2008). Inhibitory effects of fucoidan in 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Marine Biotechnology*
- Kim, W.J., Sung-Min, K., Yoo-Hee, L., Hyun, G.K., Hyung-Kwon, K., Seong, H.M., Hyun-Hyo, S., Yong-Il P., (2008). Isolation and characterization of marine bacterial strain degrading fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* sporophylls. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14** (4), 616-623
- Kim, K.J., Lee, O.H., Lee, H.H., Lee, B.Y., (2010) A 4-week repeated oral dose toxicity study of fucoidan from the Sporophyll of *Undaria pinnatifida* in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* **267**, 154-158
- Kitamura, K., Matsuo, M., Yasui, T., (1992). Enzymic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hapatopancreas of *Patinopecten yessoensis*. *Bioscience, Biotechnology & Biochemical* **56**, 490-494

- Klarzynski, O., Descamps, V., Plesse, B., Yvin, J.C., Kloareg, B., Fritig, B., (2003). Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *The American Phytopathological Society* **16** (2), 115-122
- Kobayashi, T., Imada, C., Hiraishi, A., Tsujibo, H., Miyamoto, K., Inamori, Y., Hamada, N., Watanabe, E., (2003). *Pseudoalteromonas sagamiensis* sp. nov., a marine bacterium that produces protease inhibitors., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 1807-1811
- Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., Shimeno, H., (2003). Oversulfatation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochemical Pharmacology* **65**, 173-179
- Kubes, P., Jutila, M., Payne, D., (1995). Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia-reperfusion. *Journal of the American Society for Clinical Investigation* **95**, 2510-2519
- Kusaykin, M.I., Burtseva, Y.V., Svetasheva, T.G., Sova, V.V., Zvyagintseva, T.N., (2003). Distribution of O-glycosylhydrolases in marine invertebrates enzymes of the marine mollusk *Littorina kurila* that catalyze fucoidan transformation. *Biochemistry* **68**(3), 384-392
- Kusaykin, M.I., Chizhov, A.O., Alekseeva, S.A., Bakunina, I.Y., Nedashkovskaya, O.I., Sova, V.V., Zvyagintseva, T.N., Elyakov, G.B., (2006). A comparative study of the specificity of fucoidanases of marine microorganisms and invertebrates. *Journal of Applied Phycology* **18**, 369-373
- Kusaykin, M., Bakunina, I., Sova, V., Ermakova, S., Kuznetsova, T., Besednova, N., Zaporozhets, T., Zvyagintseva, T., (2008). Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnology Journal* **3**(7), 904-915
- Kuznetsova, T.A., Besednova, N.N., Mamaev, A.N., Momot, A.P., Shevchenko, N.M., Zvyagintseva, T.N., (2003). Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk sea. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **6**, 471-473
- Lake, A.C., Vassy, R., DiBenedetto, M., Lavigne, D., LeVisage, C., Perret, G.Y., Letourneur, D., (2006). Low molecular weight fucoidan increases VEGF induced endothelial cell migration by enhancing VEGF binding to VEGFR 2 and NRP1. *Journal of Biological Chemistry* **281** (49), 37844-37852
- Lee, J.B., Hayashi, K., Hashimoto, M., Nakado, T., Hayashi, T., (2004). Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chemical Pharmacological Bulletin* **52** (9) 1091-1094

- Lee, J., Kim, J., Moon, C., Kim, S.H., Hyun, J.W., Park, J.W., Shin, T., (2008). Radioprotective effects of fucoidan in mice treated with total body irradiation. *Phytotherapy Research* **22**, 1677-1681
- Lee, N.Y., Ermakova, S.P., Zvyagintseva, T.N., Kang, K.W., Dong, Z., Choi, H.S., (2008). Inhibitory effects of fucoidan on activation of epidermal growth factor receptor and cell transformation in JB6C141 cells. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 1793-1800
- Lee, N.Y., Ermakova, S.P., Choi, H.K., Kusaikin, M.L., Shevchenko, N.M., Zvyagintseva, T.N., Choi, H.S., (2008). Fucoidan from *Laminaria cichorioides* inhibits AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cells. *Molecular Carcinogenesis* **47**, 629-637
- Li, D.Y., Xu, Z., Zhang, S.H., (1999). Prevention and cure of fucoidan of *L. japonica* on mice with hypercholesterolemia. *Food Science* **20**, 45-46
- Li, B., Gu, X.H., Xu, S.Y., (2004). Determination of the position of sulphate group in sulphated polysaccharides. *Journal of Anal science* **20**, 498-500
- Li, N., Zhang, Q., Song, J., (2005). Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* **43** (3), 421-426
- Li, B., Wei, X.J., Sun, J.L., Xu, S.Y., (2006). Structural investigation of a fucoidan containing a fucose free core from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydrate Research* **341**, 1135-1146
- Li, B., Xu, S.Y., (2007) Structural investigation of oligosaccharides in partial acid hydrolyzed products of fucoidan isolated from *Hizifia fusiforme*. *Natural Product Research & Development* **19**, 550-553
- Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R., (2008). Fucoidan structure and bioactivity. *Molecules* **13**, 1671-1695
- Li, B., Rui, X.Z., Xin, J.W., (2008). Anticoagulant activity of fucoidan from *Hizifia fusiforme*. *Agro Food Industry Hi-Tech* **19**, 22-24
- Linnemann, G., Reinhart, K., Parade, U., Philipp, A., Pfister, W., Straube, E., Karzai, W., 2000. The effects of inhibiting leukocyte migration with fucoidin in a rat peritonitis model. *Intensive Care Medicine* **26**, 1540-1546
- Liu, J.M., Bignon, J., Haroun-Bouhedja, F., Bittoun, P., Vassy, J., Fermandjian, S., Wdzieczak-bakala, J., Boisson-Vidal, C., (2005). Inhibitory effect of fucoidan on the adhesion of adenocarcinoma cells to fibronectin. *Anticancer Research* **25**, 2129-2134

- LoLeggio, L., Williams, R.M., Jones, R., (1994). Some effects of zona pellucida glycoproteins and sulfated polymers on the autoactivation of boar sperm proacrosin and activity of β -acrosin. *Journal of Reproduction and Fertility* **100**, 177-185
- Luyt, C.E., Meddahi-Pellé, A., Ho-Tin-Noe, B., Collic-Jouault, S., Guezenec, J., Louedec, L., Prats, H., Jacob, M.P., Osborne-Pellegrin, M., Letourneur, D., Michel, J.B., (2003). Low molecular weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **305** (1), 24-30
- Mahony, M.C., Oehinger, S., Clark, G.F., Acosta, A.A., Hodgen, G.D., (1991). Fucoidin inhibits the zona pellucida induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Contraception* **44** (6), 657-665
- Mahony, M.C., Clark, G.F., Oehninger, S., Acosta, A.A., Hodgen, G.D., (1993). Fucoidin binding activity and its localization on human spermatozoa. *Contraception* **48**, 277-289
- Marais M.F., Joseleau, J.P., (2001). A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research* **336**, 155-159
- Marieb 1999
- Maruyama, H., Tamauchi, H., Hashimoto, M., Nakado, T., (2005). Suppression of Th2 immune responses by Mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls. *International Archives of Allergy and Immunology* **137**, 289-294
- Maruyama, H., Tamauchi, H., Lizuka, M., Nakado, T., (2006). The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). *Planta medica* **72**, 1415-1417
- Maruyama, H., Tanaka, M., Hashimoto, M., Inoue, M., Sasahara, T., (2007). The suppressive effects of Mekabu fucoidan on an attachment of *Cryptosporidium parvum* oocysts to the intestinal epithelial cells in neonatal mice. *Life Sciences* **80**, 775-781
- Maruyama, H., Suzuki, K., Miyai, S., Ohtsuki, K., (2008). Characterization of mefucoidan as a selective inhibitor for secretory phospholipase a2IIA and the phosphorylation of mefucoidan binding proteins by A-kinase in vitro. *Biological Pharmacological Bulletin* **31** (4), 714-718
- Matou, S., Helley, D., Chabut, D., Bros, A., Fisher, A.M., (2002). Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thrombosis Research* **106**, 213-221
- Matsubara, K., Xue, C., Zhao, X., Mori, M., Sugawara, T., Hirata, T., (2005). Effects of middle molecular weight fucoidan on *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis. *International Journal of Molecular Medicine* **15** (4), 695-699

- McCaffrey, T.A., Falcone, D.J., Borth, W., Brayton, C.F., Weksler, B.B., (1992). Fucoidan is a non-anticoagulant inhibitor of intimal hyperplasia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **184** (2), 773-781
- McClure, M.O., Moore, J.P., Blanc, D.F., Scotting, P., Cook, G.M., Keynes, R.J., Weber, J.N., Davies, D., Weiss, R.A., (1992). Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection *in vitro*. *AIDS Research and Human Retroviruses* **8** (1), 19-26
- Medeiros, V.P., Queitos, K.C.S., Cardoso, M.L., Monteiro, G.R.G., Oliveira, F.W., Chavante, S.F., Guimaraes, L.A., Rocha, H.A.O., Leite, E.L., (2008). Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata* anticoagulant and antiinflammatory properties. *Biochemistry* **73** (9), 1018-1024
- Mian, A.J., Percival, E., (1973). Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcate*, and *Padina pavonia*. *Carbohydrates Research* **26**, 133-146
- Moon, H.J., Lee, S.H., Ku, M.J., Yu, B.C., Jeon, M.J., Jeong, S.H., Stonik, V.A., Zvyagintseva, T.N., Ermakova, S.P., Lee, Y.H., (2009). Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 promoter expression and down regulation of type I procollagen synthesis in human skin fibroblasts. *European Journal of Dermatology* **19** (2), 129-134
- Moreno, R.D., Hoshi, M., Barros, C., (1999). Functional interactions between sulfated polysaccharides and proacrosin implications in sperm binding and digestion of zona pellucida. *Zygote* **7**, 105-111
- Moreno, R.D., Barros, C., (2000). A basic 18-amino acid peptide contains the polysulfate-binding domain responsible for activation of the boar proacrosin acrosin system. *Biology of Reproduction* **62**, 1536-1542
- Moreno, R.D., Orihuela, P.A., Barros, C., (2001). Differential effects of polysulphates between mouse and hamster during *in vitro* fertilization. *Andrologia* **33**, 19-25
- Mourao, P.A.S., Bastos, I.G., (1987). Highly acidic glycans from sea cucumbers. *European Journal of Biochemistry* **166**, 639-645
- Mourao, P.A.S. (2004). Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents future perspectives. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 967-981
- Mourao, P.A.S, Pereira, M.S., (2000). Searching for alternatives to heparin sulfated fucans from marine invertebrates. *TCM* **9** (8), 225- 232
- Mulloy, B., Ribeiro, A.C., Alves, A.P., Vieira, R.P., Mourao, P.A.S., (1994). Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfatation at the O-2 and O-4 positions. *Journal of Biology and Chemistry* **269**, 22113-22123

- Nagamine, T., Hayakawa, K., Kusakabe, T., Takada, H., Nakazato, K., Hisanaga, E., Iha, M., (2009). Inhibitory effect of fucoidan on huh7 hepatoma cells through downregulation of CXCL12. *Nutrition and Cancer* **61** (3), 340-347.
- Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Hashimoto, S., Aiyama, R., Ueyama, S., Yokokura, T., (2000). Anti-ulcer effects and biological activities of polysaccharides from marine algae. *BioFactors* **12**, 267-274
- Nagumo, T., Nishino, T., (1996). Fucan sulfates and their anticoagulant activities. *Polysaccharides in Medicinal Applications*, Dumitriu, S., Ed., New York : Marcel Dekker. Inc, 545-574
- Nakamura, T., Suzuki, H., Wada, Y., Kodama, T., Doi, T., (2006). Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kb dependant signaling pathways through macrophage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **343**, 286-294
- Nakamura, S., Nambu, M., Ishizuka, T., Hattori, H., Kanatani, Y., Takase, B., Kishimoto, S., Amano, Y., Aoki, H., Kiyosawa, T., Ishihara, M., Maehara, T., (2007). Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on *in vitro* and *in vivo* vascularization. *Journal of Biomedical Materials Research*
- Nasu, T., Fukuda, Y., Nagahira, K., Kawashima, H., Noguchi, C., Nakanishi, T., (1997). Fucoidin, a potent inhibitor of l-selectin function reduces contact hypersensitivity reaction in mice. *Immunology Letters* **59**, 47-51
- Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M., Nagumo, T., (1989). Isolation, purification, and characterization of fucose containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood anticoagulant activities. *Carbohydrate Research* **186**. 119-129
- Nishino, T., Nagumo, T., Kiyohara, H., Yamada, H., (1991). Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydrate Research* **211**, 77-90
- Nishino, T., Kiyohara, H., Yamada, H., Nagumo, T., (1991). An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochemistry* **30** (2), 535-539
- Nishino, T., Aizu, Y., Nagumo, T., (1991). The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thrombosis Research* **64**, 723-731

- Nishino, T., Nagumo, T., (1991). The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydrate Research* **214**, 193-197
- Nishino, T., Aizu, Y., Nagumo, T., (1991). Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thrombosis Research* **62**, 765-773
- Nishino, T., Nagumo, T., (1992). Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydrate Research* **229**, 355-362
- Nishino, T., Nishioka, C., Ura, H., Nagumo, T., (1994). Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydrate Research* **255**, 213-224
- Nishino, T., Fukuda, A., Nagumo, T., Fujihara, M., Kaji, E., (1999). Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thrombosis Research* **96**, 37-49
- Nishino, T., Yamauchi, T., Horie, M., Nagumo, T., Suzuki, H., (2000). Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA.2000. *Thrombosis Research* **99**, 623-634
- Oehninger, S., Clark, G.F., Fulgham, D., Blackmore, P.F., (1992). Effect of fucoidin on human sperm-zona pellucida interactions. *Journal of Andrology* **13** (6), 519-525
- Omata, M., Matsui, N., Inomata, N., Ohno, T., (1997). Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Cardiovascular and Pharmacology* **30**, 717-724
- Onyshchenko, O.M., Kiprianova, O.A., Lysenko, T.H., Smirnov, V.V., (2002). Antibiotic properties of the *Pseudoalteromonas* genus bacteria isolated from the black Sea water and mollusks. *Mikrobiologia* **64** (3) 38-44
- Oomizu, S., Yanase, Y., Suzuki, H., Kameyoshi, Y., Hide, M., (2006). Fucoidan prevents C ϵ germline transcription and NF κ b p52 translocation for IgE production in B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**, 501-507
- Ostergaard, C., Yieng-Kow, R.V., Benfield, T., Frimodt-Moler, N., Espersen, F., Lundgren, J.D., (2000). Inhibition of leukocyte entry into the brain by selectin blocker fucoidin decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infection and Immunology* **68**(6), 3153-3157
- Pancake, S.J., Holt, G.D., Mellouk, S., Hoffman, S.L., (1992). Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *Journal of Cell Biology* **117**(6), 1351-1357

- Patankar, M.S., Oehinger, S., Barnett, T., Williams, R.L., Clark, G.F., (1993). A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *Journal of Biology Chemistry* **268**(29), 21770-21776
- Percival, E., (1968). Glucuronoxylifucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum*. 1968, *Carbohydrate Research* **7**, 272-283
- Pereira, M.S., Mulloy, B., Mourao, P.A.S., (1999). Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. *Journal of Biological Chemistry* **274** (12), 7656-7667
- Pereira, M.S., Melo, F.R., Mourao, P.A.S., (2002). Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans. *Glycobiology* **12** (10) 573-580
- Philchenkov, A., Zavelevich, M., Imbs, T., Zvyagintseva, T., Zaporozhets, T., (2007). Sensitization of human malignant lymphoid cells to etoposide by fucoidan, a brown seaweed polysaccharide. *Experimental Oncology* **29**(3), 181-185
- Ponce, N.M.A., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Flores, M.L., Stortz, C.A., (2003). Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis* : extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research* **338**, 153-165
- Preprame, S., Hayashi, K., Lee, J.B., Sankawa, U., Hayashi, T., (2001). A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chemical Pharmacology Bulletin* **49**(4), 484-485
- Preobrazhenskaya, M.E., Berman, A.E., Mikhailov, V.I., Ushakova, N.A., Mazurov, A.V., Semanov, A.V., Usov, A.I., Nifantiev, N.E., Boivin, N.V. (1997). Fucoidan inhibits leucocytes recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand. *Biochemistry & Molecular Biology International* **43**, 443-451
- Primakoff, P., Hyatt, H., Myles, D.G., (1985). A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *Journal of Cell Biology* **101**, 2239-2244
- Probst, A., Cartron, G., Watier, H., (2006). Mechanisms of action of recombinant monoclonal antibodies used in oncology. *Bulletin du Cancer* **93** (4), 107-112
- Queiroz, K.C.S., Medeiros, V.P., Queiroz, L.S., Abreu, L.R.D., Rocha, H.A.O., Ferreira, C.V., Juca, M.B., Aoyama, H., Leite, E.L., (2008). Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **62**, 303-307
- Raguene, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G., Guezennec, J., (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea

- hydrothermal vent, *alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (1), 67-73
- Religa, P., Kazi, M., Thyberg, J., Gaciong, Z., Swedenborg, J., Hedin, U., (2000). Fucoidan inhibits smooth muscle cell proliferation and reduces mitogen-activated protein kinase activity. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **20**, 419-426
- Ribeiro, A.C., Vieira, R.P., Mourao, P.A.S., Mulloy, B., (1994). A sulfated α -L-fucan from sea cucumber. *Carbohydrates Research* **255**, 225-240
- Rioux, L.E., Turgeon, S.L., Beaulieu, M., (2007). Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers* **69**, 530-537
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J., (2004). Metagenomics : genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetic* **38**, 525-552
- Rocha, H.A.O., Franco, C.R.C., Trindade, E.S., Veiga, S.S., Leite, E.L., Nader, H.B., Dietrich, C.P., (2005). Fucan inhibits chinese hamster ovary cell (CH) adhesion to fibronectin by binding to the extracellular matrix. *Planta Medica* **71**, 628-633
- Rocha de Souza, M. C., Marques, C.T., Guerra Dore, C. M., Ferreira da Silva, F.R., Oliveira Rocha, H.A., Leite, E.L., (2007). Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology* **19**, 153-160
- Romanenko, L.A., Zhukova, N.V., Rohde, M., Lysenko, A.M., Mikhailov, V.V., Stackebrandt, E., (2003). *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *Internation Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **53**, 125-131
- Rozkin, M, Levina, M.N., Efimov, V.S., Usov, A.I., (1991). The anticoagulant and lipolysis stimulating activity of polysaccharides from brown algae. *Farmakol i toksik* **3**, 48-51
- Rupérez, P., Ahrazem, O., Leal, J.A., (2002). Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 840-845
- Sakai, T., Kawai, T., Kato, I., (2004). Isolation and characterization of a fucoidan degrading marine bacterial strain and its fucoidanase. *Marine biotechnology* **6**, 335-346
- Sakai, T., Kimura, H., Kato, I., (2002). A marine strain of flavobacteriaceae utilizes brown seaweed fucoidan. *Marine biotechnology* **4**, 399-405
- Sakai, T., Kimura, H., Kato, I., (2003). Purification of sulfated fucoglucuronomannan lyase from bacterial strain of *fucobacter marina* and study of appropriate conditions for its enzyme digestion. *Marine biotechnology* **5**, 380-387

- Sakai, T., Kimura, H., Kojima, K., Shimanaka, K., Ikai, K., Kato, I., (2003). Marine bacterial sulfated fucoglucuronomannan lyase digest brown algal SFGM into trisaccharides. *Marine Biotechnology* **5**, 70-78
- Sakai, T., Ishizuka, K., Shimanaka, K., Ikai, K., Kato, I., (2003). Structure of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes. *Marine Biotechnology* **5**, 536-544
- Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, K., Iqbal, M.M., Yumoto, I., Ezura, Y., Christen, R., (1998). *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*., *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 769-774
- Sawabe, T., Tanaka, R., Iqbal, M.M., Tajima, K., Ezura, Y., Ivanova, E.P., Christen, R., (2000). Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162 and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *pseudolateromonas elyakovii* comb. nov. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **50**, 265-271
- Schaeffer, D.J., Krylov, V.S., (2000). Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicology & Environmental Safety* **45**, 208-227
- Senni, K., Gueniche, F., Foucault-Berteau, A., Igondjo-Tchen, S., Fioretti, F., Collic-Jouault, S., Durand, P., Guezennec, J., Godeau, G., Letourneur, D., (2006). Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis. *Biochemistry & Biophysics* **445**, 56-64
- Sezer, A.D., Cevher, E., Hatipoglu, F., Ogurtan, Z., Bas, A.L., Akbuga, J., (2008). Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. *Biological Pharmacology Journal* **31** (12), 2326-2333
- Sezer, A.D., Cevher, E., Hatipoglu, F., Ogurtan, Z., Bas, A.L., Akbuga, J., (2008). The use of fucosphere in the treatment of dermal burns in rabbits. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **69**, 189-198
- Shalgi, R., Matityahu, A., Nebel, L., (1986). The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. *Biology of Reproduction* **34**, 446-452
- Shibata, H., Limuro, M., Uchiya, N., Kawamori, T., Nagaoka, M., Ueyama, S., Hashimoto, S., Yokokura, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., (2003). Preventive effects of *Cladosiphon* fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* **8** (1), 59-65

- Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Aiyama, R., Iha, M., Ueyama, S., Yokokura, T., (2000). Properties of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus tokida* in gastric mucosal protection. *BioFactors* **11**, 235-245
- Soeda, S., Sakaguchi, S., Shimeno, H., Nagamatsu, A., (1992). Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochemical Pharmacology* **43** (8), 1853-1858
- Soeda, S., Ohamagari, Y., Shimeno, H., Nagamatsu, A., (1993). Preparation of oversulfated fucoidan fragments and evaluation of their antithrombotic activities. *Thrombosis Research* **72**, 247-256
- Soeda, S., Ishida, S., Honda, O., Shimeno, H., Nagamatsu, A., (1994). Aminated fucoidan promotes the invasion of 3LL cells through reconstituted basement membrane its possible mechanism of action. *Cancer Letters* **85**, 133-138
- Soeda, S., Kozako, T., Iwata, K., Shimeno, H., (2000). Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells : its possible mechanism of action. *Biochemical & Biophysical Acta* **1497**, 127-134
- Suppiramaniam, V., Vaithianathan, T., Manivannan, K., Dhanasekaran, M., Parameshwaran, K., Bahr, B.A., (2006). Modulatory effects of dextran sulfate and fucoidan on binding and channel properties of ampa receptors isolated from rat brain. *Synapse* **60**, 456-464
- Sweeney, E.A., Lortat-Jacob, H., Priestley, G.V., Nakamoto, B., Papayannopoulou, T., (2002). Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice : involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood* **99** (1), 44-51
- Tanaka, K., Sorai, S., (1970). Hydrolysis of fucoidan by abalone liver alpha-l-fucosidase. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **9** (1), 45- 48
- Teruya, T., Konishi, T., Uechi, S., Tamaki, H., Tako, M., (2007). Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. *International Journal of Biological Macromolecules* **41**, 221-226
- Teruya, T., Tatemoto, H., Konishi, T., Tako, M., (2009). Structural characteristics and *in vitro* macrophage activation of acetyl fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. *Glycoconjugate Journal*, 12-18
- Thanassi, N.M., Nakada, H., (1967). Enzymatic degradation of fucoidan by enzymes from the hepatopancreas of abalone, *Haliotis* species. *Archives of Biochemistry and biophysical* **118**, 172-177
- Tissot, B., Montdargent, B., Chevelot, L., Varenne, A., Descroix, S., Gareil, P., Daniel, R., (2003). Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway. *Biochemica & Biophysica Acta* **1651**, 5-16

- Uhm, C.S., Kim, K.B., Lim, J.H., Pee, D.H., Kim, Y.H., Kim, H., Euh, B.L., Tockgo, Y.C., (2003). Effective treatment with fucoidin for perinatal hypoxic ischemic encephalopathy in rats. *Neuroscience Letters* **353**, 21-24
- Urch, U.A., Patel, H., (1991). The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida, and with polysulfated polysaccharides. *Development* **111**, 1165-1172
- Urvantseva, A.M., Bakunina, I.Y., Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Zvyangintseva, T.N., (2006). Distribution of intracellular fucoidan hydrolases among marine bacteria of the family flavobacteriaceae. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42** (5) 484-491
- Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., Nifantiev, N.E., Usov, A.I., Pochechueva, T.V., Galanina, O.E., Bovin, N.V., (1999). Inhibitory activity of monomeric and polymeric selectin ligands. *Problem Medicinal Chemistry* **45**, 375-383
- Usov, A.I., Smirnova, G.P., Klochkova, N.G., (2001). Polysaccharides of Algae : 55 polysaccharide composition of several Brown Algae from Kamcharka. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **21** (6), 395-399
- Veena, C.K., Josephine, A., Preetha, S.P., Varalakshmi, P., Sundarapandiyam, R., (2006). Renal peroxidative changes mediated by oxalate : the protective role of fucoidan. *Life Sciences* **79**, 1789-1795
- Veena, C.K., Josephine, A., Preetha, S.P., Varalakshmi, P., (2006). Physico-chemical alterations of urine in experimental hyperoxaluria a biochemical approach with fucoidan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **59**, 419-427
- Veena, C.K., Josephine, A., Preetha, S., Rajesh, N.G., Varalakshmi, P., (2008). Mitochondrial dysfunction in an animal model of hyperoxaluria : A prophylactic approach with fucoidan. *European Journal of Pharmacology* **579**, 330-336
- Venkateswaran, K., Dohmoto, N., (2000). *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the sea of japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 565-574
- Vilela-Silva, A.C., Alves, A.P., Valente, A.P., (1999). Structure of the sulfated alpha-L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* : patterns of preferential 2-O- and 4-O- sulfation determine sperm cell recognition. *Glycobiology* **9** (9), 927-933
- Vilela-Silva, A.C., Castro, M.O., Valente, A.P., Biermann, C.H., Mourao, P.A.S., (2002). Sulfated Fucans from the Egg Jellies of the Closely Related Sea Urchins *Strongylocentrotus*

droebachiensis and *Strongylocentrotus pallidus* Ensure Species-specific Fertilization. *Journal of Biology and Chemistry* **277** (1), 379-387

Wang, P., Jiang, X., Jiang, Y., Hu, X., Mou, H., Li, M., Guan, H., (2007). *In vitro* antioxidative activities of three marine oligosaccharides. *Natural Product Research* **21** (7), 646-654

Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Li, Z., (2008). Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules* **42**, 127-132

Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Zhang, J., Li, P., (2009). Synthesized phosphorylated and aminated derives of fucoidan and their potential antioxydant activity *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules* **44**, 170-174

Wang, J., Wang, F., Zhang, Q., Zhang, X., Shi, X., Li, P., (2009). Synthesized different derivatives of low molecular fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules* **44**, 379-384

Williams, R.M., Jones, R., (1990). Specific binding of sulphated polymers to ram sperm proacrosin. *Federation of European Biochemical Societies* **270** (1,2), 168-172

Witvrouw, M., De Clerc, E., (1997). Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmaceutical* **29** (4) 497-511

Yamamoto, I., Takahashi, M., Suzuki, T., Seino, H., Mori, A., (1984). Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum*. *Japanese Journal of Experimental Medicine* **54** (4), 143-151

Yang, J.W., Yoon, S.Y., Oh, S.J., Kim, S.K., Kang, K.W., (2006). Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **346**, 345-350

Yang, C., Chung, D., Shin, I.S., Lee, H.Y., Kim, J., Lee, Y., You, S., (2008). Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Biological Macromolecules* **43**, 433-437

Yang, M., Ma, C., Sun, J., Shao, Q., Gao, W., Zhang, Y., Li, Z., Xie, Q., Dong, Z., Qu, X., (2008). Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology* **8**, 1754-1760

Yaphe, W., Morgan, K., (1959). Enzymic hydrolysis of fucoidin by *Pseudomonas atlantica* and *Pseudomonas carrageenovora*. *Nature* **463**, 761-762

- Ye, J., Li, Y., Teruya, K., Katakura, Y., Ichikawa, A., Eto, H., Hosoi, M., Hosoi, M., Nishimoto, S., Shirahata, S., (2005). Enzyme-digested fucoidan extracts derived from seaweed mozuku of *Cladosiphon novae-caledoniae* kylin inhibit invasion and angiogenesis of tumor cells. *Cytotechnology* **47**, 117-126
- Yokota, T., Nagashima, M., Ghazizadeh, M., Kawanami, O., (2009). Increased effect of fucoidan on lipoprotein lipase secretion in adipocytes. *Life Sciences* **84**, 523-529
- Zeitlin, L., Whaley, K.J., Hegarty, T.A., Moench, T.R., Cone, R.A., (1997). Tests of vaginal microbicides in the mouse genital herpes model. *Contraception* **56**, 329-335
- Zemani, F., Benisvy, D., Galy-Fauroux, I., Lokajczyk, A., Collic-Jouault, S., Uzan, G., Fisher, A.M., Boisson-Vidal, C., (2005). Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochemical Pharmacology* **70**, 1167-1175
- Zhang, Q., Li, Z., Xu, Z., Niu, X., Zhang, H., (2003). Effects of fucoidan on chronic renal failure in rats. *Planta Medica* **69**, 537-541
- Zhang, Q., Li, N., Zhao, T., Qi, H., Xu, Z., Li, Z., (2005). Fucoidan inhibits the development of proteinuria in active heymann nephritis. *Phytotherapy Research* **19**, 50-53
- Zvyagintseva, T.N., Shevchenko, N.M., Popivnich, I.B., Isakov, V.V., Scobun, A.S., Sundukova, E.V., Elyakova, L.A., (1999). A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweed. *Carbohydrate Research* **322**, 32-39

ANNEXE 1- Extraction de l'ADN

Protocole d'extraction d'Éric Rasolofo

1. Laver les cellules dans 1 ml de tampon TS (sucrose 12 %, Tris-HCl 25 mM, pH 8) et centrifugation à 6500 xG pendant quinze minutes (deux fois)
2. Première digestion enzymatique (volume de réaction 400 µl)
 - 20 µl de lysozyme à partir d'une solution de 40 mg/ml
 - 1 µl mutanolysine à partir d'une solution de 2 U/µl
 - 379 µl tampon TS
 - Incubation une heure à 37 °C (mélanger avec une pipette après trente minutes)
3. Deuxième digestion enzymatique (volume de réaction 500 µl)
 - 5 µl SDS (10 %)
 - 12 µl EDTA (250 mM)
 - 5 µl Protéinase K (20mg/ml)
 - 78 µl tampon TS
 - Incubation une heure à 55 °C (mélanger avec une pipette après trente minutes)
4. Séparation des protéines (volume de réaction de 700 µl)
 - Addition de 135 µl de NaCl (5 M) et de 65 µl de tampon TS
 - Ajout de 700 µl phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1) et centrifuger à V. max pendant quinze minutes et récupération de la phase aqueuse (deux fois)
 - Lavage au chloroforme (700 µl), centrifugation à V.max pendant quinze minutes et récupération de la phase aqueuse
5. Précipitation de l'ADN (volume 1400 µl)
 - Ajout de 700 µl d'isopropanol pour la précipitation de l'ADN et incubation à -20 °C pendant douze heures
6. Récupération de l'ADN
 - Centrifugation pour la récupération de l'ADN à 4°C pendant trente minutes à V.max
 - Lavage à l'éthanol 70 % et centrifugation à V.max pendant quinze minutes (deux fois)
 - Séchage du culot à l'air libre
 - Addition de 50 µl d'eau déionisée et traitement à l'ARNase (2 µl) pendant une heure à 37 °C
 - Stockage de l'ADN à -20 °C

ANNEXE 2- Amplification de l'ADNr16S avec les amorces universelles 27F et 788R

| Master mix | 1X (en µl) |
|---------------------------------|-------------------|
| 10 X Tampon Taq (1X final) | 5 |
| 2,5 mM dNTP (200 µM final) | 4 |
| ADN (entre 50 et 200 ng) | 1 |
| Taq polymérase (2,5U final) | 0,5 |
| H2O | 37,5 |
| 10 µM amorce F27 (0,2 µM final) | 1 |
| 10 µM amorce R788 | 1 |
| Total | 50 |

| Cycle PCR | | |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Température (°C) | Temps (secondes) | Nombre de cycle |
| 94 | 60 | |
| 94 | 30 | |
| 53 | 30 | 33 |
| 72 | 90 | |
| 72 | 300 | |
| 4 | ∞ | |

ANNEXE 3- Purification de la réaction PCR

1. Ajout de cinq volumes de tampon PBI à un volume de la réaction PCR et mélanger (250 μ l de tampon PBI à 50 μ l de PCR)
2. Vérifier que la couleur soit jaune. Si la couleur est orange ou violet, ajouter 10 μ l de 3 M d'acétate de sodium pour amener le pH à 5 et mélanger
3. Placer la colonne Qiaquick dans le tube de récolte de 2 mL
4. Centrifuger de trente à soixante secondes
5. Jeter le surnageant et replacer la colonne dans le tube
6. Ajouter 0,75 ml de tampon PE dans la colonne pour laver et centrifuger trente à soixante secondes
7. Jeter le surnageant et replacer le tube et centrifuger une minute
8. Placer la colonne dans un tube de 1,5 ml propre
9. Ajouter 50 μ l d'eau sur la colonne et centrifuger une minute pour récolter l'ADN.

ANNEXE 4- Réalisation de la réaction de séquençage

| Master mix | 1X (en μ l) |
|--|-----------------|
| 5 X tampon BigDye V3.1 | 2 |
| Big Dye V3.1 (0,5 X) | 0,5 |
| 1,5 μ M amorce F27 (0,15 μ M final) ou 1,5 μ M amorce R788 | 1 |
| ADN plasmidique des clones | 6,5 |
| Total | 10 |

| Cycle PCR | | |
|------------------|------------------|-----------------|
| Température (°C) | Temps (secondes) | Nombre de cycle |
| 99 | 60 | |
| 99 | 10 | |
| 55 | 4 | 25 |
| 60 | 200 | |
| 4 | ∞ | |

ANNEXE 5- Purification à l'éthanol

- 1- Ajouter 16 µl d'eau déminéralisé et 64 µl d'éthanol 95 % dans chacun des tubes
- 2- Mélanger en inversant
- 3- Laisser quinze minutes à température pièce
- 4- Centrifuger à 3000 x g pour trente minutes
- 5- Jeter le surnageant
- 6- Placer la plaque inversée sur un papier et centrifuger à 50 xg pour une minute
- 7- Ajouter 150 µl d'éthanol à 70 %
- 8- Mélanger en inversant
- 9- Centrifuger à 3000 x g pour dix minutes
- 10- Jeter le surnageant
- 11- Placer la plaque inversée sur un papier et centrifuger à 50 xg pour une minute

Annexe 6- Activité fucoïdane hydrolase de l'extrait protéique

Courbe étalon de fucose:

| Échantillon (ml) [à partir d'une solution mère de fucose (1mg/ml)] | Eau (ml) | Réactif de Somogy'i (ml) | Agiter au vortex Chauffer à 100 °C/ dix min Refroidir sur glace/ quatre min | Réactif de Nelson (ml) |
|---|-------------|--------------------------------|---|---------------------------|
| 0,00 | 0,2 | 0,2 | | |
| 0,04 | 0,16 | 0,2 | | 0,6 |
| 0,08 | 0,12 | 0,2 | | 0,6 |
| 0,12 | 0,08 | 0,2 | | 0,6 |
| 0,16 | 0,04 | 0,2 | | 0,6 |
| 0,2 | 0 | 0,2 | | 0,6 |

Test enzymatique :

1. Réaction enzymatique :

- 0,1 ml d'extrait protéique + 0,4 ml de substrat (4 mg fucoïdane/ ml de tampon phosphate 0,05 M pH 7,2)
- Incuber pendant quatre heures à 20 °C

2. Dosage des sucres réducteurs :

- 0,2 ml de la réaction enzymatique + 0,2 mL de réactif de Somogy'i
- Chauffer à 100 °C pendant dix minutes
- Refroidir sur glace pendant quatre minutes
- Rajouter 0,6 mL de réactif de Nelson
- Prendre la DO à $\lambda = 500$ nm
- Déterminer la quantité de sucres libérés par la réaction enzymatique par comparaison de la DO avec la courbe étalon de fucose et soustraire la quantité de sucres présente dans les témoins fucoïdanes et enzyme

Annexe 7- Production d'enzymes par différentes espèces de *Pseudoalteromonas*

| Espèces bactérienne | Production de | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------|-----------|---------|----------|--------------------|--------------|------------|-------------|--------|--------|------------|-----------|------------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------------|
| | Amylase | Chitinase | Agarase | alginate | Fucoidan hydrolase | Carraghénase | Laminarase | Pullulanase | DNAase | Lipase | Gélatinase | Caséinase | β -D-glucosidase | β -D-galactosidase | β -N-acetylglucosaminidase | β -xylosidase | α -L-Fucosidase |
| <i>P. agarivorans</i> | + | - | + | + | | + | | | + | + | + | + | | + | | | |
| <i>P. aliena</i> | + | - | | + | | | | | | + | + | v | | | | | |
| <i>P. antarctica</i> | - | - | - | - | | - | | | v | - | + | + | - | - | v | | - |
| <i>P. atlantica</i> | + | - | + | + | + | v | | | + | + | + | + | | | | | |
| <i>P. aurantia</i> | + | - | - | - | | | | | + | - | + | - | | - | | | |
| <i>P. bacteriolytica</i> | + | - | - | - | | - | | | - | + | + | + | | | | | |
| <i>P. carrageenovora</i> | - | - | - | + | + | + | | | + | + | + | + | | | | | |
| <i>P. citrea</i> | + | - | v | v | v | + | + | v | + | v | + | + | v | v | v | v | v |
| <i>P. denitrificans</i> | + | + | - | + | | | | | + | | | + | | | | | |
| <i>P. distincta</i> | - | - | - | v | | - | | | + | + | + | + | | | | | |
| <i>P. elyakovii</i> | + | - | - | + | | - | + | | + | + | + | + | | | | | |
| <i>P. espejiana</i> | + | - | - | + | | - | | | + | + | + | + | | | | | |
| <i>P. flavipulchra</i> | + | v | - | | | | | | + | - | + | + | | | | | |
| <i>P. fuliginea</i> | + | - | + | + | | | + | + | + | + | + | + | | | | | |
| <i>P. haloplanktis</i> | v | v | - | - | | - | | | + | + | + | + | | + | | | |
| <i>P. issachenkonii</i> | - | + | v | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>P. luteoviolacea</i> | + | - | - | - | | | | | + | + | + | + | | - | | | |
| <i>P. macleodii</i> | + | - | - | + | | - | | | | + | + | + | | | | | |
| <i>P. maricaloris</i> | + | - | - | + | | | | | + | - | + | + | | | | | |
| <i>P. nigrifaciens</i> | + | - | - | v | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| <i>P. paragorgicola</i> | + | - | - | | | | | | + | + | + | + | | | | | |
| <i>P. peptidolytica</i> | + | - | - | + | | | | | + | v | + | + | | - | | | |
| <i>P. phenolica</i> | + | - | - | | | | | | + | + | + | | | | | | |
| <i>P. piscicida</i> | + | - | - | - | | | | | + | - | + | + | | - | | | |
| <i>P. prydzensis</i> | + | + | - | - | | | | | - | | + | + | | - | | | |
| <i>P. rubra</i> | + | - | - | - | | - | | | + | + | + | + | | - | | | |
| <i>P. ruthenica</i> | + | - | - | + | | | | | + | + | + | v | | | | | |
| <i>P. sagamiensis</i> | + | - | - | - | | | | | | | + | | | | | | |
| <i>P. spongiae</i> | - | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>P. tetraodonis</i> | - | - | - | - | | - | | | + | + | + | + | | | | | |
| <i>P. translucida</i> | + | - | - | + | | | | | + | | + | + | | | | | |
| <i>P. tunicata</i> | + | - | - | | | | | | + | | + | + | | - | | | |
| <i>P. ulvae</i> | | | | | | | | | | | + | | | - | | | |
| <i>P. undina</i> | + | + | - | - | | - | | | + | + | + | + | | | | | |

Annexe 8- Utilisation de différents composés par diverses espèces de *Pseudoalteromonas*

| Espèces bactériennes | Utilisation de | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------|-----------|------------|-------------|--------|---------|---------|------------|---------|-----------|----------|-----------|
| | D-glucose | D-mannose | D-fructose | D-galactose | xylose | Sucrose | Maltose | Cellobiose | Lactose | Melibiose | Rhamnose | Trehalose |
| <i>P. agarivorans</i> | v | - | - | - | - | - | v | - | - | - | - | - |
| <i>P. aliena</i> | v | | | - | - | + | + | | | - | - | |
| <i>P. antarctica</i> | + | + | v | - | - | v | + | - | v | + | - | |
| <i>P. atlantica</i> | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + |
| <i>P. aurantia</i> | + | + | + | - | - | - | v | - | - | - | - | + |
| <i>P. bacteriolytica</i> | + | + | + | + | - | + | - | v | - | - | | v |
| <i>P. carrageenovora</i> | + | - | + | - | - | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>P. citrea</i> | + | + | + | v | v | - | - | - | v | - | v | v |
| <i>P. denitrificans</i> | + | | - | - | | - | + | | - | | | |
| <i>P. distincta</i> | v | v | v | - | - | - | - | - | v | v | - | - |
| <i>P. elyakovii</i> | + | v | + | + | + | v | v | - | v | - | - | - |
| <i>P. espejiana</i> | + | v | v | + | + | + | + | v | + | + | - | + |
| <i>P. flavipulchra</i> | + | + | v | - | - | + | + | | - | - | - | + |
| <i>P. fuliginea</i> | - | - | | | - | - | - | | - | | - | |
| <i>P. haloplanktis</i> | + | v | + | v | - | v | + | - | - | - | - | - |
| <i>P. issachenkonii</i> | + | - | v | + | - | + | + | - | + | + | + | - |
| <i>P. luteoviolacea</i> | + | - | - | - | - | - | v | - | - | - | - | + |
| <i>P. macleodii</i> | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>P. maricaloris</i> | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + |
| <i>P. nigrifaciens</i> | + | + | + | + | + | v | + | v | v | + | v | + |
| <i>P. paragorgicola</i> | | | | + | | | v | | - | - | | |
| <i>P. peptidolytica</i> | + | v | v | - | - | - | + | | v | - | - | |
| <i>P. phenolica</i> | + | + | | - | - | + | + | | - | - | - | + |
| <i>P. piscicida</i> | + | + | + | + | - | v | - | | - | - | - | - |
| <i>P. prydzensis</i> | + | + | - | v | - | + | + | + | - | - | - | + |
| <i>P. rubra</i> | + | + | v | - | - | - | v | - | - | - | - | + |
| <i>P. ruthenica</i> | + | | | - | - | v | - | + | - | - | | |
| <i>P. sagamiensis</i> | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>P. spongiae</i> | + | + | + | | | - | + | - | - | | - | |
| <i>P. tetraodonis</i> | + | - | - | + | - | + | + | - | v | - | - | - |
| <i>P. translucida</i> | - | | | + | - | | - | | - | - | | |
| <i>P. tunicata</i> | + | + | - | v | - | - | v | | - | - | - | + |
| <i>P. ulvae</i> | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>P. undina</i> | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + |

Annexe 9- Utilisation de différents composés par diverses espèces de *Pseudoalteromonas*
(suite)

| Espèces bactériennes | Utilisation de | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------|---------------------|-----------|------------|----------|---------|--------------|----------|------------|---------|----------|
| | D-gluconate | N-acetylglucosamine | Succinate | D-mannitol | Fumarate | Citrate | m-Erythritol | Glycérol | L-tyrosine | Acétate | Pyruvate |
| <i>P. agarivorans</i> | - | - | - | + | | - | - | - | | - | - |
| <i>P. aliena</i> | | v | | v | | | | - | | | |
| <i>P. antarctica</i> | - | - | + | + | + | + | | | | v | + |
| <i>P. atlantica</i> | - | - | + | + | + | v | - | + | - | + | + |
| <i>P. aurantia</i> | - | + | - | - | - | - | | - | - | - | |
| <i>P. bacteriolytica</i> | - | - | + | - | + | - | - | - | v | + | v |
| <i>P. carrageenovora</i> | - | - | + | + | + | + | | + | + | + | v |
| <i>P. citrea</i> | v | - | v | v | v | v | - | - | + | v | v |
| <i>P. denitrificans</i> | - | | | - | - | - | | - | + | | + |
| <i>P. distincta</i> | - | - | - | - | - | v | - | v | - | + | + |
| <i>P. elyakovii</i> | - | v | + | + | - | v | - | v | - | - | + |
| <i>P. espejiana</i> | - | - | v | v | v | + | - | v | + | + | + |
| <i>P. flavipulchra</i> | - | + | | - | + | + | - | - | + | | + |
| <i>P. fuliginea</i> | | | | - | | + | | | + | | |
| <i>P. haloplanktis</i> | v | - | v | v | + | v | v | - | v | + | + |
| <i>P. issachenkonii</i> | - | - | + | v | + | v | | - | | + | + |
| <i>P. luteoviolacea</i> | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. macleodii</i> | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + |
| <i>P. maricaloris</i> | - | | | + | - | + | - | + | - | - | - |
| <i>P. nigrifaciens</i> | v | - | v | v | - | v | | v | + | + | + |
| <i>P. paragorgicola</i> | | | | + | | - | | | - | | |
| <i>P. peptidolytica</i> | - | + | + | - | + | - | - | - | | - | |
| <i>P. phenolica</i> | - | + | | - | + | - | - | - | - | + | - |
| <i>P. piscicida</i> | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>P. prydzensis</i> | + | + | + | + | + | + | | + | v | + | + |
| <i>P. rubra</i> | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | v |
| <i>P. ruthenica</i> | | | | - | | - | | - | - | | |
| <i>P. sagamiensis</i> | - | + | | - | - | - | - | - | | - | - |
| <i>P. spongiae</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>P. tetraodonis</i> | v | + | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| <i>P. translucida</i> | | | | + | | - | | | | | |
| <i>P. tunicata</i> | | + | | - | | - | - | - | - | - | |
| <i>P. ulvae</i> | | | | | | + | | - | | | |
| <i>P. undina</i> | - | + | v | v | v | - | - | - | + | + | - |

Annexe 10- Pigmentation et température de croissance de diverses *Pseudoalteromonas*

| Espèces bactériennes | Pigmentation | Croissance à | | | | | | | | Activité bactériolytique |
|--------------------------|--------------|------------------|----|----|-------|-------|-----------|-----|-----|--------------------------|
| | | Température (°C) | | | | | % de NaCl | | | |
| | | 4 | 10 | 28 | 35/37 | 40/42 | 8 à 10% | 12% | 15% | |
| <i>P. agarivorans</i> | - | - | + | + | + | - | + | - | - | |
| <i>P. aliena</i> | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. antarctica</i> | - | + | + | + | - | - | + | - | - | |
| <i>P. atlantica</i> | - | v | | + | v | - | - | - | - | |
| <i>P. aurantia</i> | + | + | + | + | - | - | v | - | - | + |
| <i>P. bacteriolytica</i> | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| <i>P. carrageenovora</i> | - | + | + | + | + | - | + | + | - | |
| <i>P. citrea</i> | + | - | + | + | v | - | + | - | - | + |
| <i>P. denitrificans</i> | + | + | | | - | - | - | - | - | + |
| <i>P. distincta</i> | + | v | + | + | v | - | v | - | - | |
| <i>P. elyakovii</i> | - | + | + | + | + | - | + | - | - | |
| <i>P. espejana</i> | - | v | | + | + | - | + | + | - | |
| <i>P. flavipulchra</i> | + | - | + | + | + | - | + | + | - | |
| <i>P. fuliginea</i> | + | + | + | + | + | - | | | | |
| <i>P. haloplanktis</i> | - | v | | | v | - | + | + | - | + |
| <i>P. issachenkonii</i> | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| <i>P. luteoviolacea</i> | + | v | + | + | + | - | - | - | - | + |
| <i>P. macleodii</i> | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>P. maricaloris</i> | + | - | + | + | + | | + | - | - | + |
| <i>P. nigrifaciens</i> | + | v | | | v | | + | - | - | |
| <i>P. paragorgicola</i> | + | + | + | + | - | - | - | - | - | |
| <i>P. peptidolytica</i> | + | - | + | + | + | + | v | - | - | |
| <i>P. phenolica</i> | + | - | - | + | + | - | - | - | - | + |
| <i>P. piscicida</i> | + | - | + | + | + | - | + | - | - | |
| <i>P. prydzensis</i> | - | + | + | + | - | - | + | + | + | |
| <i>P. rubra</i> | + | - | + | + | + | - | - | - | - | + |
| <i>P. ruthenica</i> | + | - | + | + | + | | v | - | - | + |
| <i>P. sagamiensis</i> | + | - | - | + | + | - | - | - | - | |
| <i>P. spongiae</i> | + | - | | | + | | | | | |
| <i>P. tetraodonis</i> | - | + | + | + | v | - | + | + | - | + |
| <i>P. translucida</i> | - | + | + | + | - | - | + | - | - | |
| <i>P. tunicata</i> | + | + | + | + | + | - | | | | + |
| <i>P. ulvae</i> | + | + | + | | - | - | | | | |
| <i>P. undina</i> | - | + | | | v | | + | + | - | |