

UNIVERSITÉ PARIS 13 – INSTITUT GALILÉE  
ÉCOLE DOCTORALE MTCI – ED 563

## THÈSE CIFRE

En partenariat entre le LVTS et l'entreprise Algues & Mer

Présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13**

En Sciences de l'Ingénieur  
Mention Génie Biologique et Médical

Par

**Lucas CHOLLET**

---

Fractions polysaccharidiques bioactives extraites  
de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* pour le  
diagnostic et la thérapeutique de pathologies  
cardiovasculaires : caractérisations et  
optimisation du procédé

---

Devant le jury composé de :

Dr. Sylvia COLLIEC-JOUAULT - Ifremer	Rapporteuse
Pr. Laurent RIOS - VetAgro Sup	Rapporteur
Dr. Thomas BERTHELOT - CEA	Examineur
Dr. Florent YVERGNAUX - Solabia	Examineur
Dr. Didier LETOURNEUR – CNRS	Examineur
Pr. Frédéric CHAUBET – Université Paris 13	Directeur de thèse



« La science restera toujours la satisfaction du plus haut  
désir de notre nature, la curiosité. »

Ernest Renan - *L'avenir de la science* - 1848





# Remerciements

---

Je souhaite remercier en premier lieu Sylvia Collic-Jouault et Laurent Rios d'avoir accepté de rapporter ce mémoire ainsi que Thomas Berthelot, Florent Yvergnaux et Didier Letourneur pour leur temps consacré à juger mon travail.

Je tiens à remercier particulièrement Frédéric Chaubet d'avoir cru en moi ainsi que pour ces trois années à me diriger. Ses connaissances sur les fucoïdanes et sa volonté d'en apprendre tous les jours m'ont permis d'avancer dans ce projet même dans le doute. Il m'a également donné une autonomie dans mes recherches me permettant d'avoir ma propre opinion sur les axes à suivre et ainsi de construire ce projet de thèse selon mes envies mais en gardant toujours un esprit critique constructif. Il est, et restera, disponible pour ses étudiants peu importe la nature des problèmes rencontrés. Un grand merci Fred.

Je remercie également chaleureusement Jean-Noël Villemin pour son professionnalisme, sa bonne humeur et son management sans faille durant ces trois années. Il m'a donné goût à la vie d'entreprise, si petite soit-elle, en m'offrant la possibilité de gérer des projets en lien ou non avec ce projet, d'apporter mes connaissances scientifiques pour le développement d'Algues & Mer ou de participer à des salons de professionnels, le tout en gardant à l'esprit le côté « Business ». Ce dernier point a sans cesse axé mes recherches pour développer des outils utiles et potentiellement industrialisables. Un grand merci Jean-Noël.

Je souhaite remercier la société Algues & Mer, le laboratoire LVTS et l'ANRt qui ont financé ce projet.

Je remercie tous mes collègues du LVTS à l'Université Paris 13 sans qui ce travail n'aurait été possible : Murielle Maire pour ses mains en or et sa disponibilité, Isabelle Bataille pour ses connaissances et son sourire, Christel Barbaud pour son dynamisme et sa sensibilité, Pascaline Adonai pour sa réactivité et son efficacité, Virginie Gueguen et Graciela Pavon-Djavid pour leur disponibilité et leur bienveillance, Rima Belibel pour ses réponses (et ses questions) et son accent chanteur sans oublier Béatrice Montdargent, Thierry Avramoglou, Valérie Boucard et Daniel Ernoult. Je remercie pareillement Nadia Bouchemal, Oualid Haddad et Laurence Motte de l'Université Paris 13 à Bobigny pour leur aide précieuse.

Pour leur accueil sur Ouessant, leur joie de vivre, leurs compétences et leur réactivité, je veux remercier Lydia Rolland, Sylviane Claquin, Laurence Marie, Gaël Foulon, Goulwen Riou et Michel Stephan de la société Algues & Mer.

Tout le personnel du LVTs à Bichat, en particulier Cédric Chauvierre, Rachida Aid, Jessica Pereira et Corinne Legrand, merci à vous d'avoir été disponibles pour répondre à mes questions.

Un merci particulier à Fanny Hauquier sans qui une grande partie de ce projet n'aurait pas pu être réalisé. Ta bonne humeur et ton rire me manqueront.

Je voudrais remercier tous les étudiants, doctorants, post-doctorants que j'ai pu côtoyer durant ce projet pour les discussions tenues tant au travail qu'au bar. Pierre, Romain, Maya, Marisol, Nicolas, Louis, Bo, Audrey, Soraya, Marie-Noelle, Joana, Teresa et tous les autres que j'aurais pu oublier, merci !

Un grand merci à tous mes amis qui m'ont soutenu durant ce projet.

Je tiens à exprimer mon immense gratitude envers mes parents qui ont toujours cru en moi depuis le début de mes études il y a quelques années déjà et qui ont été d'un soutien indéfectible. De la même manière je tiens à remercier mes frères et ma belle-famille qui ont toujours été présents durant ces trois dernières années.

À ma fille, tes pleurs et tes colères durant la rédaction de ce manuscrit m'ont permis de rester éveillé, merci Margot.

Enfin, je veux remercier de tout mon cœur ma compagne, Audrey, pour son soutien dans les bons comme les mauvais moments et ce depuis de nombreuses années. Ça y est, je ne suis plus étudiant chérie je vais enfin « commencer » à travailler.





# Table des matières

---

Remerciements .....	v
Table des matières.....	ix
Liste des figures.....	xiii
Liste des tableaux.....	xix
Liste des abréviations.....	xxi
Introduction .....	3
1. Les fucoïdanes : structures, compositions et applications en nanomédecine .....	7
1.1. Origines, compositions et extraction des fucoïdanes. ....	9
1.2. Dépolymérisation et synthèse de fucoïdanes. ....	11
1.3. Propriétés biologiques des fucoïdanes.....	12
1.4. Utilisation des fucoïdanes en nanomédecine. ....	15
1.5. Analyse critique.....	16
1.6. Fucoïdanes et pathologies vasculaires .....	21
1.7. La P-sélectine, une cible moléculaire pertinente.....	24
2. Matériels et méthodes.....	29
2.1. Méthodes de caractérisation. ....	29
2.1.1 Détermination de la masse molaire par HPSEC-MALLS-dRI. ....	29
2.1.2 Détermination de l'incrément d'indice de réfraction. ....	29
2.1.3 Détermination de la composition en monosaccharides.....	30
2.1.4 Détermination de la teneur en sulfates. ....	34
2.1.5 Dosage d'amines primaires.....	35
2.1.6 Détermination de la teneur en cendres.....	36
2.1.7 Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FT-IR). ....	36
2.1.8 Spectroscopie Infra-Rouge par Réflexion Totale Atténuée (IR-ATR). ....	36
2.1.9 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). ....	37
2.1.10 Spectrométrie de masse.....	37
2.2. Méthodes de fractionnement.....	38
2.2.1 Par chromatographie d'échange d'ions basse pression (IEC). ....	38

2.2.2	Par chromatographie d'exclusion stérique préparative basse pression (SEC)	39
2.3.	Méthodes de Purification.	40
2.3.1	Purification par traitement basique.	40
2.3.2	Purification par ultrafiltration.	40
2.4.	Modifications chimiques des fucoïdanes.	44
2.4.1	Amination réductrice.	44
2.4.2	Méthacrylation.	45
2.4.3	Greffage électrochimique des fucoïdanes modifiés par polymérisation radicalaire électro-amorcée.	45
2.5.	Tests d'affinité avec la P-sélectine.	47
2.5.1	Par onde acoustique de surface (SAW).	47
2.5.2	Par résonance plasmonique de surface (SPR).	47
3.	Production d'un fucoïdane de grade pharmaceutique à partir d'Ascophyscient®	51
3.1.	Étude de la reproductibilité d'Ascophyscient®	53
3.1.1	Masse molaire	53
3.1.2	Spectroscopie FT-IR.	57
3.1.3	Composition en monosaccharides et en sulfates	58
3.1.4	Analyses élémentaires	66
3.1.5	Cendres totales	68
3.1.6	Composition moyenne d'Ascophyscient®	71
3.2.	Mise au point d'une fraction de fucoïdane de bas poids moléculaire (LMWF) de grade pharmaceutique.	72
3.2.1	Méthode de purification.	72
3.2.2	Optimisation du procédé de purification.	76
3.2.3	Production d'un lot clinique.	81
4.	Identification des espèces bioactives.	85
4.1.	Fractionnement d'Ascophyscient®.	86
4.2.	Détermination de l'affinité des fractions de fucoïdanes avec des biomarqueurs.	88
4.3.	Fonctionnalisation des puces SPR et SAW.	90
4.4.	Greffage des polysaccharides méthacrylés sur les puces SPR et SAW.	94
4.5.	Analyses SPR.	98
4.6.	Analyses SAW.	102
	Discussion générale	107

Conclusions et perspectives.....	115
Annexe A – Chromatogrammes HPSEC-MALLS-dRI.....	119
Annexe B – Spectres FT-IR.....	125
Annexe C – Chromatogrammes dosage HPLC .....	131
Annexe D – COA des lots d’Ascophyscient®.....	137
Annexe E – Rapports d’analyses du fucoïdane à usage clinique.....	149
Annexe F – Spectres RMN <sup>1</sup> H des produits méthacrylés .....	159
Annexe G – Utilisation de Liquide Ionique pour la synthèse de fucoïdanes aminés.....	161
Annexe H – Fonctionnalisation de NPs de PLGA avec GraftFast®	165
Annexe I - Communications .....	167
Références.....	193





# Liste des figures

---

<b>Figure 1.1</b> – Évolution du nombre d'articles publiés mentionnant les fucoïdanes (d'après Web of Science). Axe gauche : nombre de publications pour « Fucoïdan* », axe droit : nombre de publications pour « Fucoïdan* + Nano* ».....	8
<b>Figure 1.2</b> – Schéma de la structure de la paroi cellulaire d'algues brunes. Adapté de [8]. .....	9
<b>Figure 1.3</b> – Quelques structure des fucoïdanes retrouvés dans différentes espèces d'algues brunes (A) <i>Chorda filum</i> [37] ; (B) <i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> et <i>Fucus evanescens</i> [31, 32, 40] et d'invertébrés marins (C) <i>Ludwigothuria grisea</i> [38] ; (D) <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> [26] et (E) <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> [39]. .....	10
<b>Figure 1.4</b> – Illustration d'une rupture de plaque d'athérome aboutissant à la formation d'un thrombus. Adapté de [250]. .....	22
<b>Figure 1.5</b> – Imagerie TEMP d'un modèle d'ischémie-reperfusion du myocarde chez le rat à l'aide d'une FF radiomarquée au technétium ( $^{99m}\text{Tc}^3$ ). Le thrombus est localisé par les flèches rouges. Adapté de [200]. .....	23
<b>Figure 1.6</b> – Schéma du PSGL-1 et de son domaine responsable de l'interaction avec la P-sélectine, portant le SLe <sup>x</sup> (cadre rouge). Adapté de [248]. .....	25
<b>Figure 2.1</b> – Gradient de solvant pour l'analyse de la composition en monosaccharides par dérivation pré colonne. ....	33
<b>Figure 2.2</b> – Chromatogramme de la solution de référence. (1) mannose, (2) ribose, (3) ac. glucuronique, (4) glucose, (5) galactose, (6) xylose, (7) fucose. ....	33
<b>Figure 2.3</b> – Schéma du montage d'ultrafiltration.....	41
<b>Figure 2.4</b> – Amination réductrice de fucoïdanes. ....	45
<b>Figure 2.5</b> – Méthacrylation de fucoïdanes. ....	45
<b>Figure 2.6</b> – Schéma de la cellule électrochimique. ....	46
<b>Figure 3.1</b> – Procédé de production d'Ascophyscient® développé par A&M. ....	52
<b>Figure 3.2</b> –Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 1. ....	55
<b>Figure 3.3</b> – Spectre FT-IR du lot 1. ....	57

<b>Figure 3.4</b> – Glucose dérivé au MPP, adapté de [271].	59
<b>Figure 3.5</b> – Chromatogramme de la solution de référence. (1) Mannose, (2) Ribose, (3) Ac. Glucuronique, (4) Glucose, (5) Galactose, (6) Xylose, (7) Fucose.	59
<b>Figure 3.6</b> – Chromatogramme d'un échantillon d'Ascophyscient®. (1) Mannose + Ac. Mannuronique, (2) Ac. Guluronique, (3) Impureté, (4) Ribose, (5) Ac. Glucuronique, (6) Glucose, (7) Galactose, (8) Xylose, (9) Fucose.	60
<b>Figure 3.7</b> – Réponse de différents sucres au dosage au carbazole.	61
<b>Figure 3.8</b> – Mécanisme réactionnel de la condensation du carbazole sur un acide uronique.	62
<b>Figure 3.9</b> – Intermédiaires réactionnels à partir de différents sucres.	62
<b>Figure 3.10</b> – Chromatogramme HPLC d'une solution d'Acide Mannuronique (a), de Mannose + Acide Mannuronique (b) et d'alginate (c).	63
<b>Figure 3.11</b> – Analyse par spectrométrie de masse d'un hydrolysat d'Ascophyscient®.	64
<b>Figure 3.12</b> - Composition théorique d'Ascophyscient®. Les chiffres présents sous les unités de galactose, mannose, glucose et acide glucuronique représentent la quantité de chacune de ces unités pour les cinq unités fucose.	67
<b>Figure 3.13</b> – Résultats d'ATG sur le lot n°3 d'Ascophyscient®.	70
<b>Figure 3.14</b> – Comparaison des chromatogrammes d'HPSEC-MALLS-dRI de : (a) Ascophyscient® et (b) ASPHY-pH.	73
<b>Figure 3.15</b> – Chromatogramme HPLC d'ASPHY-pH.	73
<b>Figure 3.16</b> – Spectres FT-IR du précipité blanc (a) et d'Ascophyscient® (b).	74
<b>Figure 3.17</b> – Spectres FT-IR du précipité marron (c) et d'Alginates (d).	75
<b>Figure 3.18</b> – Spectres RMN <sup>1</sup> H (99,8% D <sub>2</sub> O, 500MHz) d'Ascophyscient® (a), d'ASPHY-pH (b), Ascophyscient® dialysé (c) et Ascophyscient® lyophilisé avant atomisation (d). En vert, les protons anomériques d'α-L-fucoses ; en jaune, les protons H-2, H-3 et H-4 de fucoses sulfatés ; en rouge, les protons H-2, H-3, H-4 et H-5 d'oses et d'acides uroniques non sulfatés ; en bleu, les protons de groupements méthyls. Adapté de [200].	77
<b>Figure 3.19</b> – Chromatogrammes HPSEC-MALLS-dRI des six LMWF ayant subis ou non un traitement pH10 ou une dialyse.	79

<b>Figure 3.20</b> – Flowcharts de l’ancien et du nouveau procédés de production de FUCO.....	80
<b>Figure 3.21</b> – Kit d’injection de l’agent de contraste contenant du FUCO. ....	81
<b>Figure 4.1</b> – Chromatogrammes HPLC des fractions IEC1 (a) et IEC2 (b).....	86
<b>Figure 4.2</b> – Chromatogrammes HPSEC-MALLS-dRI des fractions IEC1 (a) et IEC2 (b). ....	87
<b>Figure 4.3</b> – Allure type des sensorgrammes obtenus par analyses SPR et SAW, adapté de [284]......	89
<b>Figure 4.4</b> – Mécanisme chimique de construction d’un film GraftFast®. ....	90
<b>Figure 4.5</b> – Schéma réactionnel de l’amination réductrice des fucoïdanes avec du 1,3-diaminopropane [3]......	91
<b>Figure 4.6</b> – Schéma réactionnel de la méthacrylation des fucoïdanes avec de l’anhydride méthacrylique. ....	92
<b>Figure 4.7</b> – Spectres RMN 1H (99,8% D2O, 500MHz) d’Ascophyscient® dialysé en bleu et d’Ascophyscient® dialysé méthacrylé en rouge. ....	93
<b>Figure 4.8</b> – Fonctionnalisation des puces SPR par polymérisation radicalaire électro-amorcée de polysaccharides méthacrylés. ....	94
<b>Figure 4.9</b> – Voltamogrammes des greffages de (a) sels de diazoniums, (b) Ascophyscient®, (c) IEC1, (d) IEC2 et (e) Dextrane T10.....	96
<b>Figure 4.10</b> – Spectres IR-ATR des puces SAW fonctionnalisées par : en noir les sels de diazoniums, en rouge le Dextrane T10, en vert Ascophyscient®, en bleu foncé IEC1, en bleu clair IEC2. ....	97
<b>Figure 4.11</b> – Photo des voies d’une puce SPR.....	98
<b>Figure 4.12</b> – Schémas en 3D et photos du moule. Schémas obtenus avec le logiciel SolidWorks®. ....	99
<b>Figure 4.13</b> – Composition du PEDOT:PSS. ....	99
<b>Figure 4.14</b> – Schéma de greffage de polysaccharides (en rouge) sur une puce SPR après dépôt de PEDOT:PSS (en bleu). ....	100
<b>Figure 4.15</b> – Sensorgrammes SPR de (a) Ascophyscient®, (b) IEC1, (c) IEC2, (d) Dextrane T10, (e) Sels d’aryl-diazoniums.....	101

<b>Figure 4.16</b> – Photo et schéma d’une puce SAW. Greffage en une étape des polysaccharides (en rouge).....	102
<b>Figure 4.17</b> – Sensorgrammes SAW de (a) Ascophyscient®, (b) IEC1 et (c) IEC2. Signal en noir : P-sélectine, en rouge : E-sélectine, en vert : L-sélectine. Les trois sélectines injectées ont une concentration de 100 nM.....	103
<b>Figure A.1</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 1.....	119
<b>Figure A.2</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 2.....	120
<b>Figure A.3</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 3.....	120
<b>Figure A.4</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 4.....	121
<b>Figure A.5</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 5.....	121
<b>Figure A.6</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 6.....	122
<b>Figure A.7</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 7.....	122
<b>Figure A.8</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 8.....	123
<b>Figure A.9</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 9.....	123
<b>Figure A.10</b> – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 10. ....	124
<b>Figure B.1</b> – Spectre FT-IR du lot 1. ....	125
<b>Figure B.2</b> – Spectre FT-IR du lot 2. ....	125
<b>Figure B.3</b> – Spectre FT-IR du lot 3. ....	126
<b>Figure B.4</b> – Spectre FT-IR du lot 4. ....	126
<b>Figure B.5</b> – Spectre FT-IR du lot 5. ....	127
<b>Figure B.6</b> – Spectre FT-IR du lot 6. ....	127
<b>Figure B.7</b> – Spectre FT-IR du lot 7. ....	128
<b>Figure B.8</b> – Spectre FT-IR du lot 8. ....	128
<b>Figure B.9</b> – Spectre FT-IR du lot 9. ....	129
<b>Figure B.10</b> – Spectre FT-IR du lot 10. ....	129
<b>Figure C.1</b> – Chromatogramme HPLC du lot 1. ....	131

<b>Figure C.2</b> – Chromatogramme HPLC du lot 2. ....	132
<b>Figure C.3</b> – Chromatogramme HPLC du lot 3. ....	132
<b>Figure C.4</b> – Chromatogramme HPLC du lot 4. ....	133
<b>Figure C.5</b> – Chromatogramme HPLC du lot 5. ....	133
<b>Figure C.6</b> – Chromatogramme HPLC du lot 6. ....	134
<b>Figure C.7</b> – Chromatogramme HPLC du lot 7. ....	134
<b>Figure C.8</b> – Chromatogramme HPLC du lot 8. ....	135
<b>Figure C.9</b> – Chromatogramme HPLC du lot 9. ....	135
<b>Figure C.10</b> – Chromatogramme HPLC du lot 10. ....	136
<b>Figure F.1</b> – Spectres RMN <sup>1</sup> H (99,8% D <sub>2</sub> O, 500MHz) d’Ascophyscient® dialysé en bleu et d’Ascophyscient® dialysé méthacrylé en rouge. ....	159
<b>Figure F.2</b> – Spectres RMN <sup>1</sup> H (99,8% D <sub>2</sub> O, 500MHz) d’une fraction IEC1 en bleu et d’une fraction IEC1 méthacrylée en rouge. ....	159
<b>Figure F.3</b> – Spectres RMN <sup>1</sup> H (99,8% D <sub>2</sub> O, 500MHz) d’une fraction IEC2 en bleu et d’une fraction IEC2 méthacrylée en rouge. ....	160
<b>Figure F.4</b> – Spectres RMN <sup>1</sup> H (99,8% D <sub>2</sub> O, 500MHz) de Dextrane T10 en bleu et de Dextrane T10 méthacrylé en rouge. ....	160
<b>Figure G.1</b> - Benzoate de 1-éthyl-3-méthyl imidazolium.....	162
<b>Figure G.2</b> – Spectres RMN <sup>1</sup> H (99,8% DMSO, 500MHz) du Benzoate de 1-éthyl-3-méthyl imidazolium. ....	162



# Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1.1</b> – Propriétés biologiques et cibles identifiées des fucoïdanes .....	13
<b>Tableau 1.2</b> – Applications en nanomédecine des nanosystèmes contenant des fucoïdanes.....	15
<b>Tableau 1.3</b> – Données physico-chimiques et origines des fucoïdanes utilisés en nanomédecine.....	18
<b>Tableau 2.1</b> – Préparation de la solution de référence, de la solution standard et de la solution de MPP. ....	31
<b>Tableau 2.2</b> – Facteur de correction F en fonction de la température. ....	42
<b>Tableau 3.1</b> – Période de récolte des dix lots analysés. ....	53
<b>Tableau 3.2</b> – Masses molaires en poids ( $M_w$ ), polydispersité ( $M_w/M_n$ ) et proportion (w/w) des deux populations macromoléculaires. ....	56
<b>Tableau 3.3</b> – Composition en fucose, acides uroniques et sulfates en g/100g des lots de LMWF par dosages colorimétriques. ....	58
<b>Tableau 3.4</b> – Attribution des pics de spectrométrie de masse. ....	65
<b>Tableau 3.5</b> – Composition en monosaccharides en g/100g des lots d'Ascophyscient® déterminée par dosage HPLC.....	65
<b>Tableau 3.6</b> – Composition en monosaccharides en ratios molaires par rapport au fucose des lots d'Ascophyscient® déterminée par dosage HPLC. ....	66
<b>Tableau 3.7</b> – Analyses élémentaires en g/100g. ....	66
<b>Tableau 3.8</b> – Pourcentage de cendres en poids des lots d'Ascophyscient®. ....	68
<b>Tableau 3.9</b> – Analyse ICP-MS d'un lot d'Ascophyscient®.....	69
<b>Tableau 3.10</b> – Caractéristiques physico-chimiques moyennes d'Ascophyscient®. ....	71
<b>Tableau 3.11</b> – Comparaison des paramètres physico-chimiques d'un lot d'Ascophyscient® (lot 7) et de son homologue purifié (dénommé ASPHY-pH). ...	72

<b>Tableau 3.12</b> – Analyses physico-chimiques sur six LMWF ayant subis ou non un traitement pH10 ou une dialyse.....	78
<b>Tableau 4.1</b> – Compositions chimiques des fractions IEC1 et IEC2.....	86
<b>Tableau 4.2</b> – Rendements des réactions d’amination et de méthacrylation. ....	93
<b>Tableau G.1</b> – Matrice d’expérience. ....	164
<b>Tableau G.2</b> – Influence des paramètres.....	164
<b>Tableau H.1</b> – Diamètre hydrodynamique et potentiel Zeta de NPs de PLGA fonctionnalisées ou non par des fucoïdanes. ....	165



# Liste des abréviations

---

ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ASPHY	Ascophyscient®
ATG	Analyse Thermo Gravimétrique
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
A&M	Algues et Mer
COA	Certificate Of Analysis
DEAE	DiEthylAminoEthyl
DOR	Dépolymérisation Oxydo-Réductrice
dRI	differential Refractive Index
FDA	Food and Drug Administration
FF	Fraction de Fucoïdane
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
HBPM	Héparine de Bas Poids Moléculaire
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPSEC	High Performance Size Exclusion Chromatography
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IEC	Ion Exchange Chromatography
IMPD	Investigational Medicinal Product Dossier
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
LDL	Low Density Lipoprotein
LI	Liquide Ionique
LVTS	Laboratory for Vascular Translational Science
MALLS	MultiAngle Laser Light Scattering

$\overline{Mn}$	Masse molaire Moyenne en nombre
MPP	3-Méthyl-1-Phényl-2-Pyrazoline-5-one
MPUP	Matière Première à Usage Pharmaceutique
MST	MicroScale Thermophoresis
$\overline{Mw}$	Masse molaire moyenne en poids
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NPs	Nanoparticules
NS	Nano-système
NWP	Normalized Water Permeability
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PdI	Polydispersity Index
PLGA	Poly Lactic-co-Glycolic Acid
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAW	Surface Acoustic Wave
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor-1
SEC	Size Exclusion Chromatography
SPR	Surface Plasmon Resonance
TEMP	Tomographie par Émission Mono Photonique
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TMP	Trans Membrane Pressure

# *Introduction*



# Introduction

---

Les fucoïdanes sont des polysaccharides marins extraits d'algues brunes possédant de remarquables propriétés biologiques. Leur origine végétale, l'absence d'effets indésirables ainsi que leur prix abordable dû à des procédés de production simples les rendent prometteurs en santé humaine. Cependant, la difficulté d'obtenir des structures et des compositions chimiques reproductibles d'un lot à l'autre de par leur provenance sont des freins pour leur développement en santé humaine et en particulier en nanomédecine. Jusqu'à présent, la seule manière efficace de produire des fucoïdanes est à partir d'organismes vivants pour en isoler des fractions polysaccharidiques bioactives, la synthèse totale par voie chimique ou enzymatique de polysaccharides n'étant pas encore viable d'un point de vue industriel.

La nanomédecine, définie comme l'application des nanotechnologies à la médecine, se développe depuis les deux dernières décennies de façon exponentielle. Que ce soit pour le diagnostic, la thérapeutique ou les deux combinés (théranostique), ces outils nanométriques ont des applications dans de nombreux domaines notamment dans la libération contrôlée de médicaments, l'imagerie *in vivo*, les biomatériaux ou encore des implants actifs et offrent la possibilité de traitements personnalisés pour les patients.

Depuis peu, la nanomédecine fait appel aux fucoïdanes principalement dans les domaines du cancer, de la médecine régénératrice ainsi que pour les pathologies cardiovasculaires, des domaines dans lesquels les nanotechnologies font des progrès quotidiennement.

La société Algues & Mer qui produit des fucoïdanes de bas poids moléculaire extraits de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* dénommés Ascophyscient®, collabore depuis 2009 avec le LVTS dans le domaine des pathologies cardio-vasculaires. Dans cette optique, un laboratoire commun fût créé en 2013 par les deux partenaires suivi de mon recrutement en 2014 en thèse Cifre pour mener à bien un projet visant à produire un agent de contraste clinique pour l'imagerie moléculaire en scintigraphie de l'athérosclérose et de ses conséquences, ainsi qu'identifier les espèces macromoléculaires bioactives présentes dans Ascophyscient®. Par ailleurs mon rôle fût également d'être l'intermédiaire entre le LVTS et la société A&M et d'apporter une expertise scientifique à l'entreprise.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une revue bibliographique sur les fucoïdanes en apportant des éléments sur les différentes

structures et compositions chimiques retrouvées chez ces polysaccharides ainsi que sur leurs applications potentielles en nanomédecine. Nous traiterons également de la P-sélectine, une protéine transmembranaire exprimée par les plaquettes activées et les cellules endothéliales en situation pathologique et présentant une affinité nanomolaire pour les fucoïdanes.

Après avoir décrit dans le chapitre 2 les matériels et méthodes employés lors de ces trois années, je présenterai dans le chapitre 3 une partie importante de mon projet consacrée à la sécurisation du procédé d'obtention d'Ascophyscient® en assurant la reproductibilité des paramètres physico-chimiques de dix lots produits de 2012 à 2017. Dans ce chapitre nous nous intéresserons également à l'optimisation de techniques de purification pour produire une fraction de fucoïdane de bas poids moléculaire de grade pharmaceutique avec des procédés fiables et industriellement viables. Enfin, nous verrons les mesures mises en œuvre pour produire un lot clinique de fucoïdane au sein de l'entreprise Algues & Mer sur l'île d'Ouessant pour son utilisation dans le cadre de l'imagerie en scintigraphie chez l'homme, en suivant les procédures décrites dans la Pharmacopée Européenne

Le dernier chapitre sera consacré à l'identification des fractions de fucoïdane bioactives vis-à-vis des sélectines, et plus particulièrement la P-sélectine, au sein d'Ascophyscient® en utilisant des techniques chromatographiques. L'affinité de ces fractions pour les sélectines sera évaluée par résonance plasmonique de surface (SPR) et par onde acoustique de surface (SAW) après recouvrement des puces analytiques avec les fractions de fucoïdane à l'aide de la technologie Graftfast®.

Une revue sur l'utilisation du fucoïdane en nanomédecine publiée en 2016 est présentée en annexe ainsi que les différents résultats d'analyses spectrométriques, les certificats d'analyses fournis par la société A&M des dix lots d'Ascophyscient® utilisés. Des travaux réalisés en marge de ce projet comme l'optimisation de la synthèse de fucoïdanes aminés à l'aide de liquides ioniques et la fonctionnalisation de nanoparticules de PLGA par des fucoïdanes à l'aide de la technologie GraftFast® sont également présentés.

# *Chapitre 1*

---

Les fucoïdanes : structures,  
compositions et applications en  
nanomédecine

---





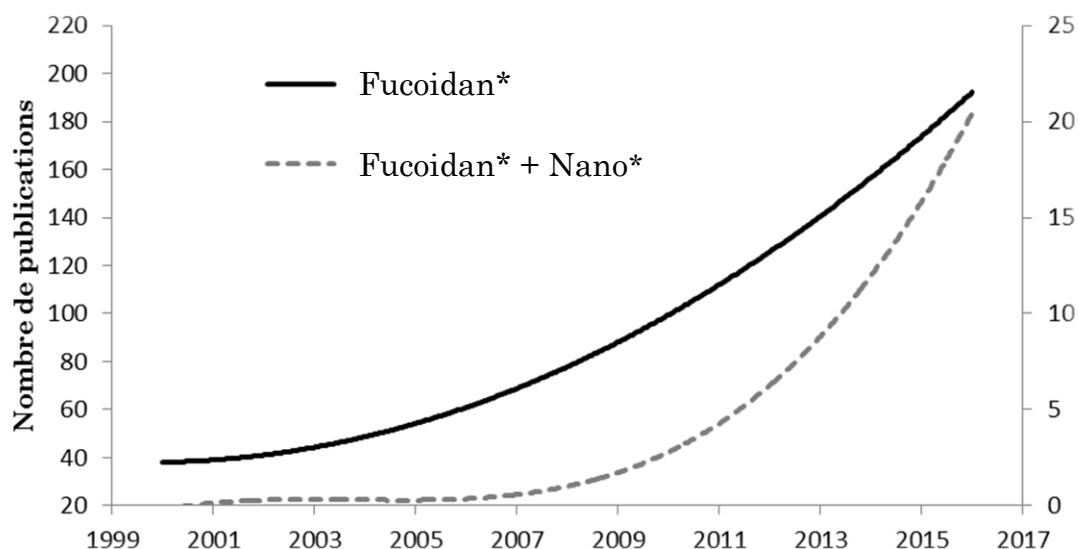
# 1. Les fucoïdanes : structures, compositions et applications en nanomédecine

---

Les fucoïdanes sont des polysaccharides sulfatés marins possédant un large éventail d'activités biologiques avec de nombreuses applications cliniques potentielles. Ces polysaccharides extraits d'algues brunes sont le plus souvent composés de nombreuses espèces macromoléculaires plus ou moins bien définies. En un demi-siècle, le nombre de publications et de revues présentant les activités imputées aux fucoïdanes n'a cessé de croître. Ils possèdent entre autres des activités pro/anti-thrombotiques, angiogéniques, anti-cancéreuses, anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Des activités biologiques proches de celles de l'héparine, un glycosaminoglycane d'origine animale d'un poids moléculaire d'environ 15 kDa, ont été retrouvées avec des fractions de fucoïdanes (FF) de bas poids moléculaire (c.à.d. <30kDa) [1-3]. Ces fractions seraient plus attrayantes d'un point de vue économique (faible coût de production, disponibilité des algues) et sanitaire (origine végétale vs origine animale).

La nanomédecine, aussi définie comme les nanotechnologies appliquées au champ médical, a considérablement gagné en intérêt ces dernières années. Les nano-systèmes (NS) comme, de façon non-exhaustive, les nanoparticules (NPs), les vecteurs polymériques, les nanotubes, les micelles ou les liposomes ont des propriétés dépendantes de leur taille qui, à l'échelle nanométrique, jouent des rôles significatifs dans les systèmes biologiques. Pendant plus de cinquante ans, les NSs ont été développés pour des usages en thérapeutique et en diagnostic. Plus récemment, ils ont trouvé une utilité en médecine régénératrice dans le développement de supports biocompatibles nanostructurés pour l'organisation et la prolifération cellulaire [4]. De plus, la nanothéranostique ou nanomédecine théranostique a été développée en combinant le diagnostic et la thérapeutique afin de contrôler simultanément la libération et la biodisponibilité du médicament sur le site pathologique approprié [5]. L'intérêt majeur de la nanomédecine reste la libération contrôlée de médicaments pour une médecine personnalisée définie comme « le bon médicament au bon patient au bon moment » [6, 7]. La plupart de ces nouveaux outils biomédicaux sont actuellement employés comme traitements par administration orale ou parentérale pour combattre le cancer, la déficience en fer ou la sclérose en plaque à titre d'exemples [4]. Lovrić *et al.* ont recensé les produits commercialisés et ceux avec le plus fort potentiel [4].

Récemment, la nanomédecine a fait part de l'utilité de ces molécules dans le développement de traitements ou d'outils diagnostics pour le cancer, la médecine régénératrice ou les pathologies cardiovasculaires ; des domaines dans lesquels l'utilisation des nanotechnologies est en plein essor. Depuis 2005, le nombre de publications rapportant l'utilisation des fucoïdanes en nanomédecine est en nette hausse et représentait en 2016 10% des publications mentionnant les fucoïdanes (Figure 1.1).



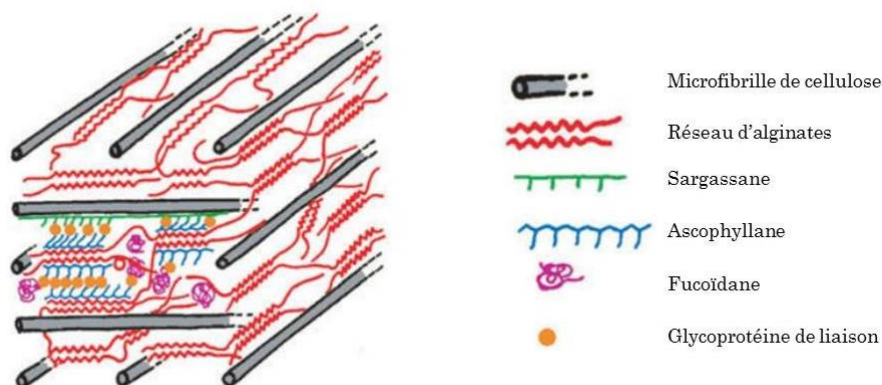
**Figure 1.1** – Évolution du nombre d'articles publiés mentionnant les fucoïdanes (d'après Web of Science). Axe gauche : nombre de publications pour « Fucoïdan\* », axe droit : nombre de publications pour « Fucoïdan\* + Nano\* ».

Ces chiffres démontrent les relations de plus en plus étroites des fucoïdanes et de la nanomédecine. Ces molécules bon marché et facilement accessibles seront clairement parties intégrantes du développement de futurs outils thérapeutiques, diagnostiques ou théranostiques dès lors que des réponses scientifiques et techniques claires seront apportées quant à leur obtention et aux relations structure-fonction.

## 1.1. Origines, compositions et extraction des fucoïdanes.

Les fucoïdanes appartiennent à une large famille de polysaccharides marins sulfatés : les fucanes, principalement constitué de L-fucoses sulfatés et qui inclue également les ascophyllanes (xylofucoglycuronane et xylofucomanuronane) et les sargassanes (glycuronofucogalactane) [8, 9]. Les fucoïdanes ont été découverts en 1913 par Kylin dans quatre algues brunes : *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, et *Laminaria saccharina* [10]. Depuis, les fucoïdanes ont été identifiés dans plus de 70 espèces d'algues brunes (*Phaeophyceae*) [11-19], dans les parois cellulaires de certains invertébrés marins comme le concombre de mer (*Holothuroidea*) ainsi que dans la zone pellucide des ovules d'oursins (*Echinoidea*) [11, 20, 21].

Les fucoïdanes se situent dans la matrice extracellulaire des algues brunes [8] (Figure 1.2). Les paramètres éco-physiologiques (espèce d'algue, zone et période de récolte, position sur la zone intertidale, etc.) influencent leur composition [22, 23]. Les fucoïdanes jouent un rôle dans la régulation ionique et osmotique ainsi que dans le support mécanique de la paroi cellulaire de l'algue [9, 24]. De ce fait, les algues situées le plus haut dans la zone intertidale et donc les plus exposées à l'air et au dessèchement, sont celles possédant le pourcentage de fucoïdanes le plus élevé.

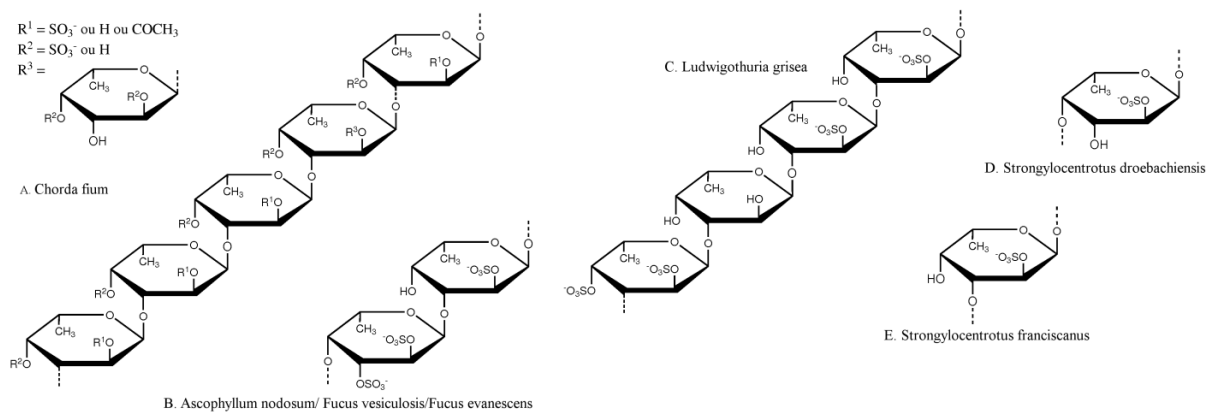


**Figure 1.2** – Schéma de la structure de la paroi cellulaire d'algues brunes.  
Adapté de [8].

Chez les oursins, les fucoïdanes jouent un rôle dans le processus de fertilisation. On les retrouve dans le manteau entourant les gamètes femelles (zone pellucide) où ils participent aux réactions acrosomiques espèce-dépendantes [25, 26], les caractéristiques physico-chimiques des fucoïdanes variant d'une espèce à l'autre. Dans le cas des concombres de mer, les fucoïdanes auraient un

rôle dans le support mécanique de la paroi cellulaire dans l'environnement salin, au même titre que les algues [27].

La composition chimique des fucoïdanes est extrêmement variable et dépend des paramètres éco-physiologiques évoqués. Conchie et Percival furent les premiers à élucider la structure de fucoïdanes extraits de *Fucus vesiculosus* [28]. 40 ans plus tard, Kloareg *et al.* ont déterminé que les fucoïdanes étaient principalement composés de 50%-90% de L-fucoses, 35%-45% de sulfates et moins de 8% d'acides uroniques. Les premières structures proposées font état d'un enchaînement linéaire d'unités L-fucoses sulfatées en O-4, liés par des liaisons glycosidiques  $\alpha(1\rightarrow2)$  et comprenant une petite proportion d'oses neutres, probablement sous forme de ramifications, autres que le fucose : galactose, mannose, xylose et glucose [8, 9]. En 1993, Patankar *et al.* ont publié une structure d'un fucoïdane commercial de *Fucus vesiculosus* composé principalement d'un enchaînement  $\alpha(1\rightarrow3)$ -L-fucose avec des sulfates en positions O-4 et quelques unités L-fucoses branchées sur les positions O-2 et O-4 [29]. Par la suite, des études ont mis en évidence l'existence d'unités récurrentes pour des fractions purifiées de différentes espèces d'algues [30-37]. Les structures sont des squelettes linéaires de  $\alpha(1\rightarrow3)$ -L-fucose avec alternativement des liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$ , les groupements sulfates étant majoritairement retrouvés sur les positions O-2 et O-4 [38, 39]. Les fucoïdanes extraits d'animaux marins présentent des structures chimiques plus régulières avec peu ou pas de ramifications (Figure 1.3).



**Figure 1.3** – Quelques structure des fucoïdanes retrouvés dans différentes espèces d'algues brunes (A) *Chorda filum* [37] ; (B) *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *Fucus evanescens* [31, 32, 40] et d'invertébrés marins (C) *Ludwigothuria grisea* [38] ; (D) *Strongylocentrotus droebachiensis* [26] et (E) *Strongylocentrotus franciscanus* [39].

Concernant l'extraction des fucoïdanes d'algues brunes, on dénombre presque autant de méthodes que d'articles publiés. Cependant, une méthode type peut être proposée : une première extraction est réalisée avec un solvant

organique (ex. acétone, toluène, etc.) sur l'algue fraîche broyée pour donner un extrait sec qui pourra être par la suite traité avec du méthanol, de l'éthanol ou du formaldéhyde pour éliminer les résidus hydrophobes comme les lipides ou les colorants. Les alginates, des polysaccharides linéaires d'acides mannuroniques et glucuroniques, encore présents, sont précipités par traitement au calcium souvent suivi d'une hydrolyse acide ou basique permettant de se débarrasser des polysaccharides autre que les fucoïdanes comme les laminarines (polyglucose linéaire) et permettant de diminuer la masse molaire des fucoïdanes. Depuis peu, des extractions utilisant les micro-ondes, les ultrasons ou bien des enzymes sont développées pour éviter l'utilisation de solvants organiques, augmenter le rendement et diminuer le temps du procédé [41-44]. Ces techniques restent cependant difficilement applicables à l'industrie à l'heure actuelle. Les conditions d'extraction influencent la composition finale des fucoïdanes [16, 19] qui restent des mixtures complexes d'espèces macromoléculaires avec une large distribution de poids moléculaire (100-1000 kDa). Il est maintenant admis que le terme « fucoïdanes » fait référence à des polymères composés majoritairement de L-fucoses sulfatés mais pas à des polysaccharides bien définis, il doit donc être employé comme terme générique comme proposé par Larsen en 1966 [45]. Les fucoïdanes purifiés ou fractionnés doivent de ce fait être mentionnés comme « fraction de fucoïdane » (FF). Nous utiliserons les deux termes dans ce manuscrit en gardant à l'esprit qu'il recouvre en réalité des mélanges d'espèces macromoléculaires qu'il reste encore aujourd'hui très difficile à caractériser dans leur totalité, en particulier du fait de la diversité des origines mais aussi des nombreux procédés de préparation que nous évoquons par la suite

## **1.2. Dépolymérisation et synthèse de fucoïdanes.**

Les polysaccharides restent encore de nos jours les seules macromolécules biologiques non synthétisables de façon industrielle. Bien que d'énormes progrès aient été réalisés en glycobiologie et en glycomédecine, conduisant au développement de protocoles pour synthétiser des oligosaccharides [46], que ce soit par voie enzymatique ou par synthèse totale, la préparation industrielle sur mesure de FF reste difficilement réalisable actuellement, de par les faibles rendements et les temps de réactions élevés. Il n'est donc pas surprenant qu'aujourd'hui aucune méthode pour obtenir de façon reproductible une FF bioactive bien décrite ne soit disponible.

Diverses méthodes de dépolymérisation de fucoïdanes bruts ont été développées pour diminuer leur masse molaire tout en réduisant leur polydispersité : par hydrolyse acide [16, 47], par clivage radicalaire [48], par dégradation enzymatique à l'aide de fucoïdanases extraites de bactéries, de champignons marins ou des sécrétions digestives de certains mollusques [49-54]

ou encore par irradiation gamma [55-57]. Ces méthodes sont souvent à l'origine de modifications structurales (débranchement, désulfatation, etc.) qui peuvent avoir un impact sur les propriétés biologiques de la molécule. Une approche alternative de l'extraction est la synthèse de FF, que ce soit par un procédé enzymatique ou par synthèse chimique totale. Les fucoïdanasés sont capables de dégrader sélectivement les squelettes composés de fucose des fucoïdanes offrant des fragments avec des structures bien définies. Silchenko *et al.* ont isolé plusieurs fucoïdanasés [51, 58] et ont développé une méthode permettant le criblage et la détection de ces enzymes dans des colonies bactériennes [53]. Une autre approche, proposée par Nifantiev *et al.* est la synthèse chimique d'oligofucosides. À ce jour, son équipe a réussi la synthèse totale d'un hexadecafucoside [59, 60] tout en contrôlant l'emplacement des groupements sulfates. Cette approche permet l'obtention de FF de différents types : une FF composée de résidus  $\alpha$ -L-fucoses liés par des liaisons (1 $\rightarrow$ 3)- comme pour les fucoïdanes retrouvés chez *Laminaria saccharina* [33, 36] ou *Chorda filum* [37] et une composée de résidus  $\alpha$ -L-fucoses liés alternativement par des liaisons (1 $\rightarrow$ 3) et (1 $\rightarrow$ 4) comme retrouvé chez *Ascophyllum nodosum* ou *Fucus evanescens* par exemple. Récemment, Wu *et al.* ont décrit une technique permettant la synthèse totale d'un polysaccharide (arabinogalactane) composé de 92 unités monosaccharidiques en une seule étape [61]. Cette méthode, si elle était applicable à d'autres polysaccharides, donnerait la possibilité de fabriquer à façon des FF et permettrait alors d'établir des relations structure-activité précises pour les nombreuses propriétés biologiques des fucoïdanes.

### **1.3. Propriétés biologiques des fucoïdanes.**

L'intérêt de la communauté scientifique pour les fucoïdanes, plus particulièrement les FF de bas poids moléculaire, est majoritairement dû à leur large spectre d'activités biologiques recensées de leur découverte à aujourd'hui. Le Tableau 1.1 regroupe les principales propriétés attribuées aux fucoïdanes ainsi que les cibles biologiques identifiées. Depuis plusieurs décennies, les polysaccharides et leurs fractions de bas poids moléculaire intéressent les scientifiques pour leur capacité à interagir dans un grand nombre de processus biologiques [62]. Les variations structurales comme le degré de substitution en groupements chimiques tels que des acides carboxyliques, des acétyles ou des sulfates, sont impliquées dans les réponses biologiques observées [63, 64]. Cependant leurs activités sont souvent attribuées à leurs charges négatives ainsi que leur degré de sulfatation plutôt qu'à une structure polysaccharidique spécifique comme c'est le cas par exemple pour l'héparine [65].

Jusqu'à présent, de nombreuses cibles ont été identifiées dans le sang et les tissus pour expliquer les activités biologiques des fucoïdanes. L'activité anticoagulante, l'une des plus étudiée en référence à l'héparine, peut-être expliquée par les interactions avec des inhibiteurs de la thrombine, la serpine antithrombine (AT) et le second cofacteur de l'héparine (HCII), potentialisant leurs activités [18]. De même, l'inhibition de l'activation du système du complément par des voies classiques et alternatives est responsable de l'activité anti-inflammatoire des fucoïdanes en inhibant la formation ou le fonctionnement de certaines enzymes comme la C4, C4b,2a, C3, et C3b,Bb [66].

**Tableau 1.1** – Propriétés biologiques et cibles identifiées des fucoïdanes

Propriétés biologiques	Cibles identifiées	Références
Anticoagulant / anti-thrombotique	AT, HCII	[18, 48, 67-73]
Anti-complément	C4, C4b,2a, C3, et C3b,Bb	[66, 69, 74]
Antivirale	CD4	[75-83]
Anti-inflammatoire	P- et L-sélectines	[3, 69, 72, 84-98]
Effets angiogéniques	VEGFs, bFGF, FGF-2 // $\alpha 6$ , $\beta 1$ et sous-unités intégrines PECAM-1	[1, 2, 17, 18, 69, 72, 84, 99-107]
Anti-cancer	Caspases-3, -8 et -9, MAPK et ses inhibiteurs, HIF-1	[38, 108-142]
Anti-diabète	$\alpha$ -glucosidase, $\alpha$ -amylase	[143-155]
Stimulant immunitaire	Cellules NK, cellules T, cellules dendritiques	[156-161]
Antioxydant	-	[162-182]

L'activité antivirale est assurée par la liaison des fucoïdanes aux glycoprotéines CD4 sur les lymphocytes T, une immunoglobuline essentielle au processus d'infection des cellules hôtes par les virus [81]. Les fucoïdanes possédant un haut taux de sulfates inhibent l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase, deux enzymes digestives, augmentant ou interrompant le délai d'absorption du glucose. Les FF les plus sulfatées ont un effet inhibiteur supérieur aux autres FF, mettant en avant le rôle probable des interactions électrostatiques dans le processus d'inhibition [144, 145]. Dans les tissus, les fucoïdanes ont un effet sur plusieurs enzymes impliquées dans la mitose ou l'apoptose cellulaire comme les caspases-3, -8 et -9 ou les mitogen-activated protein kinase (MAPK) et leurs inhibiteurs [111, 112, 122], stimulant ou inhibant ces facteurs de façon opposée dans les cellules cancéreuses et les cellules saines (effet protecteur). De plus, les FF de bas poids moléculaire inhibent l'accumulation du facteur induit par hypoxie-1 (HIF-1) qui favorise l'angiogenèse tumorale dans les cellules

cancéreuses [119]. Les fucoïdanes possèdent également la faculté de se lier aux facteurs de croissance vasculaire endothéliaux (VEGF) ainsi qu'à leurs récepteurs naturels VEGFR2, leur offrant des propriétés pro/anti-angiogéniques [17, 103, 183, 184]. L'affinité de l'ordre du nanomolaire des fucoïdanes pour le VEGF les rendent prometteurs pour le développement d'anti-cancéreux.

Les propriétés biologiques des fucoïdanes semblent principalement modulées par la masse molaire et le taux de sulfate qui, comme décrit précédemment, dépendent du matériel de départ et de la méthode d'extraction. L'un des exemples les plus frappants est l'activité anti/pro-angiogénique des fucoïdanes. Pomin *et al.* ont démontré que des fucoïdanes d'origines variées possédaient une activité anti-angiogénique due à leur capacité à interférer avec les facteurs de croissance vasculaire endothéliaux (VEGFs) ainsi qu'avec certains facteurs de croissance fibroblastiques (FGF-2) [18]. Cependant, Matou *et al.* ont constaté un effet pro-angiogénique avec des fucoïdanes extraits d'*Ascophyllum nodosum* qui stimuleraient l'expression des sous-unités d'intégrines  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$  et PECAM-1 à la surface des cellules endothéliales, ayant pour conséquence une augmentation de l'angiogénèse induite par FGF-2 [106]. Nifantiev *et al.* ont passé en revue un grand nombre d'études portant sur les propriétés angiogéniques de fucoïdanes provenant de différentes algues brunes pour mettre en avant de potentielles relations structure-activité. Ils en ont conclu que les FF extraits d'*Ascophyllum nodosum* possédaient une activité anti-angiogénique si leurs masses molaires étaient supérieures à 30 kDa et une activité pro-angiogénique si leurs masses étaient inférieures à 30 kDa [17].

Les fucoïdanes possèdent donc un grand nombre de bioactivités contre des situations pathologiques avec une remarquable absence d'effets secondaires adverses. De part ces propriétés, les fucoïdanes ont été inclus dans des nanosystèmes pour le diagnostic, la thérapeutique ou en théranostique.



## 1.4. Utilisation des fucoïdanes en nanomédecine.

Les polysaccharides sulfatés, principalement les fucoïdanes, ont été inclus dans des NSs pour le diagnostic, la délivrance de médicaments et l'ingénierie tissulaire [185, 186]. Des FF sont également utilisées comme stabilisateurs de NPs [187-191] ou pour étudier le comportement de suspensions aqueuses de NPs composées d'un mélange de chitosane/fucoïdane [192-194]. Nous ne détaillerons pas ces études ici car nous nous intéressons aux NSs contenant des FF avec des applications directes en diagnostic et en thérapeutique. Ces applications sont recensées dans le Tableau 1.2. Le Tableau 1.3, quant à lui, regroupe les origines et les données physico-chimiques des FF utilisées dans ces études. Ce travail bibliographique, ici mis à jour, a été publié dans le journal *Marine drugs* en 2016 [195] où l'analyse en détails des études les plus pertinentes y est présentée, la publication est disponible en Annexe H de ce manuscrit.

**Tableau 1.2** – Applications en nanomédecine des nanosystèmes contenant des fucoïdanes.

Application	Références
Agent d'imagerie	[196-202]
Transport de protéines	[203-207]
Transport de médicaments	[208-220]
Anticoagulant	[221, 222]
Transport de gènes	[223, 224]
Médecine régénératrice	[225-234]

Les NSs contenant des FF ont été en première instance développés pour la délivrance d'agents thérapeutiques [186] puis pour la médecine régénérative et plus récemment pour le diagnostic. La plupart d'entre eux ont une structure obtenue à partir d'une mixture de FF et de chitosane, un polysaccharide cationique avec une alternance aléatoire de  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucosamine et de *N*-acetyl-D-glucosamine. La formation de ces NSs est due aux interactions électrostatiques entre les groupements sulfates et ammoniums qui génèrent des architectures multicouches stables sur une large gamme de pH adaptées à une administration orale ou parentérale. Différentes méthodes sont utilisées pour obtenir ces NSs telles que l'émulsion, l'auto-assemblage, la cocervation, la complexation de poly-électrolytes ou la réticulation ionique, sans risque de modification de la structure du polymère. Dans certains cas, les fucoïdanes ont été utilisés pour leurs propriétés biologiques intrinsèques mais il ressort de la majorité de ces études qu'ils ont été employés surtout pour leur capacité à former des structures stables

avec le chitosane ainsi que pour leur innocuité. Il est intéressant de noter que les paramètres physico-chimiques des chitosanes utilisés dans les études sont plus détaillés que pour les FF pour lesquelles les données sont souvent limitées voir absentes. En effet, comme présenté dans le Tableau 1.3, la plupart des auteurs se limitent à ne fournir que l'origine des FF ce qui a pour conséquence de limiter les possibilités de comparaison entre les études. Seulement cinq études fournissent suffisamment de données pour pouvoir discuter leurs résultats [198, 200, 216, 218, 235]. Ce manque de données ne permet pas le développement de médicaments composés de ces polysaccharides [236]. Par ailleurs, les développements pharmaceutiques pour l'amélioration de la santé humaine nécessitent des FF reproductibles et parfaitement caractérisées. Sans cela, la reproductibilité des résultats devient aléatoire et les conclusions des études ne sont valables que pour la seule fraction étudiée.

## **1.5. Analyse critique.**

Les polysaccharides sont l'une des trois familles de macromolécules avec les protéines et les acides nucléiques. Ces deux dernières sont synthétisables depuis plusieurs décennies, cependant, les polysaccharides comme les fucoïdanes possèdent des structures complexes ralentissant la réalisation de cette étape essentielle pour leur développement en santé humaine. Plus généralement, une fois la structure d'un polysaccharide identifiée comme étant responsable d'une activité biologique, elle doit souvent être synthétisée pour établir ou confirmer cette relation structure-activité. Néanmoins, les méthodes de synthèse dédiées sont chronophages, limitées aux oligosaccharides et pratiquées principalement par des laboratoires spécialisés utilisant des procédés pouvant atteindre des mois voire des années avant d'être validés de par la complexité structurale de ces composés. Cela a pour conséquence, malgré le rôle prépondérant des polysaccharides et des oligosaccharides dans de nombreux processus biologiques, que l'on ne retrouve que très peu d'agents thérapeutiques et diagnostiques composés de polysaccharides sur le marché. En sus des médicaments inspirés de monosaccharides comme pour le traitement contre le virus de la grippe Tamiflu (oseltamivir phosphate ; Roche, Bâle, Suisse), deux molécules ressortent : le tétrasaccharide acarbose (Precose, Glucobay ; Bayer, Leverkusen, Allemagne) et l'héparine [237]. Il est à noter que ces molécules n'ont pas été synthétisées mais isolées et qu'elles ont atteint la phase clinique avant que des relations structure-activités n'aient été établies. L'héparine de bas poids moléculaire (HBPM) (Lovenox ; Sanofi, Gentilly, France), principalement extraite des intestins de porc et fractionnée par chromatographie, clivage chimique ou hydrolyse enzymatique, reste le seul polysaccharide utilisé en santé humaine depuis sa première étude clinique rapportée au début des années 80 [238-241]. La production de FF suit le

même procédé mais le matériau brut est d'origine végétale, prévenant ainsi de toute contamination attribuée aux produits d'origine animale. Cependant, les autorités de santé ont renforcé la législation concernant les nouveaux produits pharmaceutiques ces dernières années, à cause de scandales sanitaires impliquant notamment les HBPM en 2008 [242], rendant très difficile voire impossible la commercialisation de FF sans source fiable. Dans tous les cas, les scientifiques et les entreprises désireux de développer des NSs contenant des FF jusqu'au stade clinique doivent fournir des données robustes sur leur produit.

Bien que l'intérêt des FF en santé humaine soit clairement établi, leur développement clinique dans le cadre de la nanomédecine reste un défi car il nécessite non seulement une approche translationnelle incluant des partenariats avec des compagnies pharmaceutiques tout en respectant les directives des agences de santé [243], mais aussi la mise en place d'un procédé sécurisé pour la production de FF reproductibles. D'un côté, il est maintenant largement accepté que les taux de L-fucoses et de sulfates ainsi que la masse molaire sont des paramètres structuraux majeurs dont la variation affecte directement les propriétés biologiques. D'un autre côté, chaque espèce d'algue possède son propre type de fucoïdane dont la composition dépend également des conditions d'extraction. Des fucoïdanes de grade pharmaceutique avec une distribution des masses molaires bien définie ainsi qu'une composition chimique entièrement caractérisée sont maintenant nécessaires. Enfin, la détermination de relations structure-activité poussées permettront de sélectionner les FF les plus pertinentes pour un développement clinique chez l'Homme.

**Tableau 1.3 – Données physico-chimiques et origines des fucoïdanes utilisés en nanomédecine.**

Étude	Objectif	Origine des fucoïdanes	Masse molaire	Taux de sulfate (g/100g)	Autres données	Remarques
Bonnard <i>et al.</i> [197, 199]	Ciblage de la P-sélectine pour imagerie TEMP	<i>F. vesiculosus</i>	57 kDa / 23 kDa	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Changotade <i>et al.</i> [229]	Prétraitement de substituts de tissus osseux	-	-	-	-	-
Da Silva <i>et al.</i> [222]	Préparation de NPs pour usage thérapeutique	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Huang <i>et al.</i> [209]	Relargage contrôlé de gentamicine	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Huang <i>et al.</i> [214]	Relargage contrôlé de curcumine	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Huang <i>et al.</i> [205]	Relargage contrôlé de FGF-2 avec des NPs	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Huang <i>et al.</i> [206]	Relargage contrôlé de SDF-1 avec des NPs	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Hwang <i>et al.</i> [220]	Fabrication de NPs de FF et de cisplatine pour le traitement de cancer	<i>F. vesiculosus</i>	20 – 200 kDa	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Jeong <i>et al.</i> [226]	Design d'un matériau de soutien pour la régénération du tissu osseux	-	-	-	-	-
Jin <i>et al.</i> [230]	Régénération du tissu osseux	<i>U. pinnatifida</i>	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Haewon Biotech Company
Kimura <i>et al.</i> [212]	Évaluation des effets cytotoxiques de NPs contenant des FF	<i>C. okamuranus</i>	2-10 kDa	-	-	Fucoïdanes extraits et purifiés par les auteurs
Kurosaki <i>et al.</i> [234]	Relargage d'ADN avec des microparticules (MPs) contenant des FF	-	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Lee <i>et al.</i> [211]	Relargage contrôlé de doxorubicine	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Lee <i>et al.</i> [234]	Ingénierie tissulaire	<i>U. pinnatifida</i>	-	34,2%	62,12% de polysaccharides	Fucoïdanes commerciaux de Haewon Biotech Company
Li <i>et al.</i> [202]	Ciblage de la P-sélectine pour imagerie TEP	-	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich

**Tableau 1.3 - Suite**

Étude	Objectif	Origine des fucoïdanes	Masse molaire	Taux de sulfate (g/100g)	Autres données	Remarques
Lira <i>et al.</i> [244]	Préparation et évaluation de NPs contenant des FF	<i>S. cymosum</i>	53 kDa	-	-	Fucoïdanes extraits et purifiés par les auteurs
Lowe <i>et al.</i> [227]	Design d'un matériau de soutien pour la régénération du tissu osseux	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Lu <i>et al.</i> [219]	NPs contenant des FF pour le relargage d'anticancéreux	<i>L. japonica</i>	80 kDa	34%	-	Fucoïdanes commerciaux de NOVA Pharma & Liposome Biotech Company
Manivasagan <i>et al.</i> [217]	Relargage contrôlé de doxorubicine	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Nakamura <i>et al.</i> [204]	Relargage contrôlé de FGF-2	<i>K. crassifolia</i>	-	-	-	Fucoïdanes extraits et purifiés par les auteurs
Park <i>et al.</i> [207]	Relargage contrôlé d'acide $\alpha$ -lipoïque	-	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Haewon Biotech Company
Pinheiro <i>et al.</i> [216]	Relargage contrôlé de poly-L-lysine	<i>F. vesiculosus</i>	57,26 kDa	-	40,2% Fucose 2,98% Xylose 0,55% Mannose 3,6% Galactose 9,17% Ac. uronique 0,11% Rhamnose 0,21% Glucose	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Puvaneswary <i>et al.</i> [228]	Design d'un matériau de soutien pour la régénération du tissu osseux	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Rocha Amorim <i>et al.</i> [218]	NPs d'argent recouvertes de FF pour le traitement de cellules cancéreuses	<i>S. schröderi</i>	-	-	35% de polysaccharides 3,2% de protéines 7,1% de composés phénoliques Ratio molaire du fucose par rapport aux xyloses, acides glucuronique, galactoses et sulfates.	Fucoïdanes extraits et purifiés par les auteurs
Rouzet <i>et al.</i> [198]	Ciblage de la P-sélectine pour imagerie TEMP	<i>A. nodosum</i>	7,2 - 9,6 kDa	27%	45% L-fucose 25% acide D-glucuronique	Fucoïdanes commerciaux d'Algues & Mer

## Chapitre 1 : Les fucoïdanes

**Tableau 1.3 – Suite et fin**

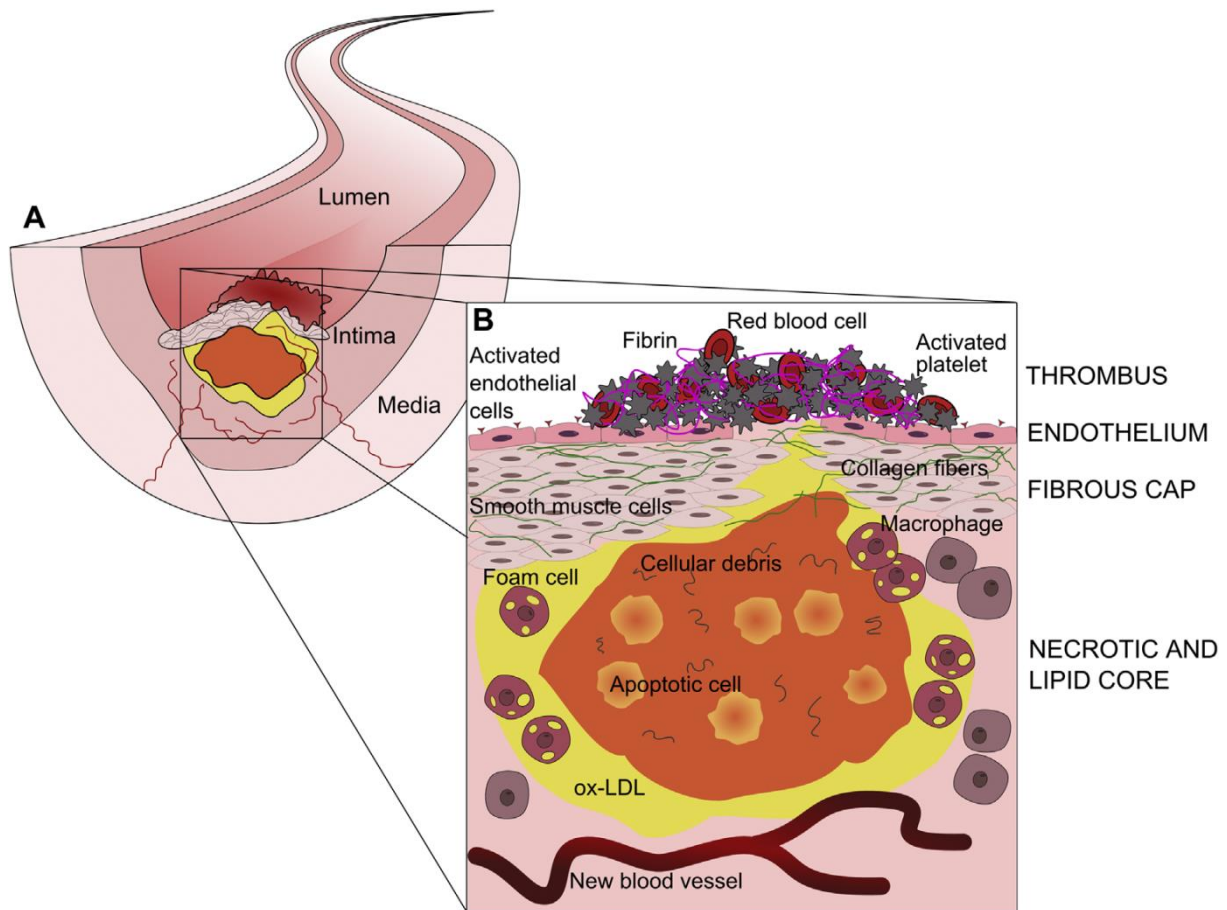
Étude	Objectif	Origine des fucoïdanes	Masse molaire	Taux de sulfate (g/100g)	Autres données	Remarques
Saboural <i>et al.</i> [200]	Ciblage de la P-sélectine pour imagerie TEMP	<i>A. nodosum</i>	6,2 kDa	21,7%	25% L-fucose 16,1% acides uroniques	Fucoïdanes commerciaux d'Algues & Mer
Sezer <i>et al.</i> [223]	Relargage d'ADN avec des microparticules (MPs) contenant des FF	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa			Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Sezer <i>et al.</i> [232, 233]	Traitement de brûlures cutanées à l'aide de NPs	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa			Fucoïdanes commerciaux de Sigma-Aldrich
Suzuki <i>et al.</i> [235]	Ciblage de la P-sélectine pour IRM	<i>A. nodosum</i>	8 kDa	27%	45% L-fucose 25% acide D-glucuronique	Fucoïdanes commerciaux d'Algues & Mer
Tae Young <i>et al.</i> [231]	Design d'un matériau de soutien pour la régénération du tissu osseux	-	-	-	-	-
Venkatesan <i>et al.</i> [225]	Design d'un matériau de soutien pour la régénération du tissu osseux	-	-	-	-	-
Wu <i>et al.</i> [215]	Relargage contrôlé de berbérine	-	80 kDa	-	-	Fucoïdanes commerciaux de NOVA Pharma & Liposome Biotech Company
Yu <i>et al.</i> [208]	Relargage contrôlé de berbérine	<i>L. japonica</i>	-	24,3%	3,5% de groupements carbonyles	Fucoïdanes commerciaux de NOVA Pharma & Liposome Biotech Company
Yu <i>et al.</i> [116]	Relargage de FF sur sulfatés par voie orale	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa	41,7%	-	Fucoïdanes commerciaux de NOVA Pharma & Liposome Biotech Company

## **1.6. Fucoïdanes et pathologies vasculaires**

Les pathologies cardiovasculaires sont devenues une préoccupation majeure de santé publique. L'athérosclérose et ses conséquences comme l'athéromatose, les accidents vasculaires cérébraux ou les ischémies sont actuellement les principales causes de mort et de handicap dans le monde selon l'OMS [245].

L'athérosclérose est une pathologie au développement précoce et silencieux (aucun signe clinique). Elle démarre lorsqu'un dépôt de lipoprotéines de basse densité (LDL en anglais) se crée dans la paroi artérielle au niveau de l'intima. Les LDL vont alors être oxydées par des radicaux libres qui sont principalement produits par le fer présent dans le groupement hème des globules rouges, mais peuvent également être des conséquences du tabagisme ou bien d'autres pathologies comme le diabète [246, 247]. Les LDL oxydées (LDL<sub>ox</sub>) vont alors initier le processus d'inflammation vasculaire conduisant à l'activation des cellules endothéliales (cellules au contact du sang) qui vont exprimer à leur surface des protéines d'adhésion cellulaire [248, 249] permettant de recruter les leucocytes circulants, et provoquant l'adhésion des plaquettes sanguines à la surface des cellules endothéliales activées. Par la suite, de nombreux mécanismes cellulaires vont engendrer la formation d'un cœur lipidique et nécrotique, l'athérome, ainsi qu'une chape fibreuse isolant l'athérome de la lumière artérielle, la sclérose. Cette plaque d'athérosclérose, alors dite stable, peut évoluer vers les situations pathologiques décrites précédemment si elle venait à se déstabiliser puis à se rompre. En effet, lors de la rupture, les composants de la chape fibreuse rentreraient en contact avec le sang ce qui aboutirait à la formation d'un thrombus, comme présenté sur la Figure 1.4, pouvant diminuer la lumière artérielle (sténose) ou l'obstruer complètement (thrombus occlusif).

Les techniques d'imagerie médicale actuelles permettent de détecter la présence de tissus ischémiés ou l'occlusion de certaines artères. Cependant, ces techniques sont soit dépendantes de l'opérateur (échographie), irradiantes pour le patient (angiographie et scanner à rayons X) ou encore très coûteuses et peu disponibles (IRM). Enfin, la tomographie par émission mono-photonique (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP), des techniques d'imagerie nucléaire, permettent une excellente sensibilité de détection mais possèdent une faible résolution spatiale par rapport à l'IRM ou le scanner à rayons X. Ces méthodes d'imagerie ne permettent pas, à l'heure actuelle, de réaliser un diagnostic précoce du développement de l'athérosclérose ni de détecter la présence de biomarqueurs propres à ces pathologies.



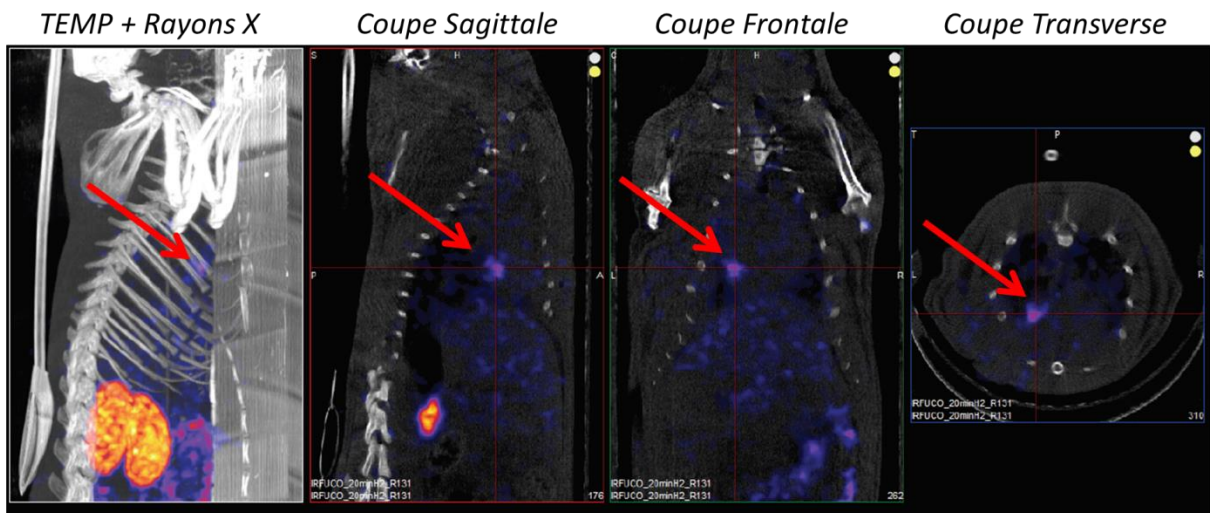
**Figure 1.4** – Illustration d’une rupture de plaque d’athérome aboutissant à la formation d’un thrombus. Adapté de [250].

Néanmoins, des biomarqueurs pertinents ont été identifiés dans de précédentes études : les sélectines [248]. Les P-, E- et L-sélectines, des protéines membranaires qui jouent un rôle dans le recrutement des leucocytes et le processus d’extravasation ainsi que dans la réponse inflammatoire vasculaire, ont été présentées comme les principales cibles de l’activité anti-inflammatoire des fucoïdanes [3, 84].

Dans ce contexte, le LVTS a développé des outils pour le diagnostic à l’aide de l’imagerie moléculaire de l’athérothrombose en utilisant des fucoïdanes. D’une part, le recouvrement de NPs d’oxyde de fer avec des fucoïdanes a permis d’imager les thrombus en utilisant l’IRM [235]. D’autre part, la vectorisation de l’activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rtPA) par des microcapsules polymériques couplées au fucoïdane [251] ou par une FF modifiée par un oligopeptide de lysine a permis de cibler le thrombus en situation artérielle ou veineuse [252]. Enfin, nous avons considéré une approche rationnelle dans le but de développer un agent de contraste clinique pour l’imagerie TEMP utilisant des FF (voir [3, 196, 198, 235]) (Figure 1.5). À partir du travail de Varki *et al.* [91], la



P-sélectine fut confirmée comme cible moléculaire pertinente d'une FF commerciale de bas poids moléculaire extraite d'*Ascophyllum nodosum* (Ascophyscient®, A&M, île d'Ouessant, France) [3]. En 2013, un laboratoire commun fût créé avec l'entreprise A&M suivi de mon recrutement en tant que chef de projet en 2014, pour valider le procédé de production d'une FF reproductible avec des paramètres physico-chimiques bien définis. En 2015, ces fucoïdanes ont été labellisés « matière première à usage pharmaceutique » (MPUP) par l'ANSM. Aujourd'hui, ils sont partie intégrante du projet Européen Nanoathero pour le développement d'un marqueur TEMP pour l'athérothrombose humaine [253]. Les essais cliniques débiteront en 2018.



**Figure 1.5** – Imagerie TEMP d'un modèle d'ischémie-reperfusion du myocarde chez le rat à l'aide d'une FF radiomarquée au technétium ( $^{99m}\text{Tc}^3$ ). Le thrombus est localisé par les flèches rouges. Adapté de [200].

## **1.7. La P-sélectine, une cible moléculaire pertinente.**

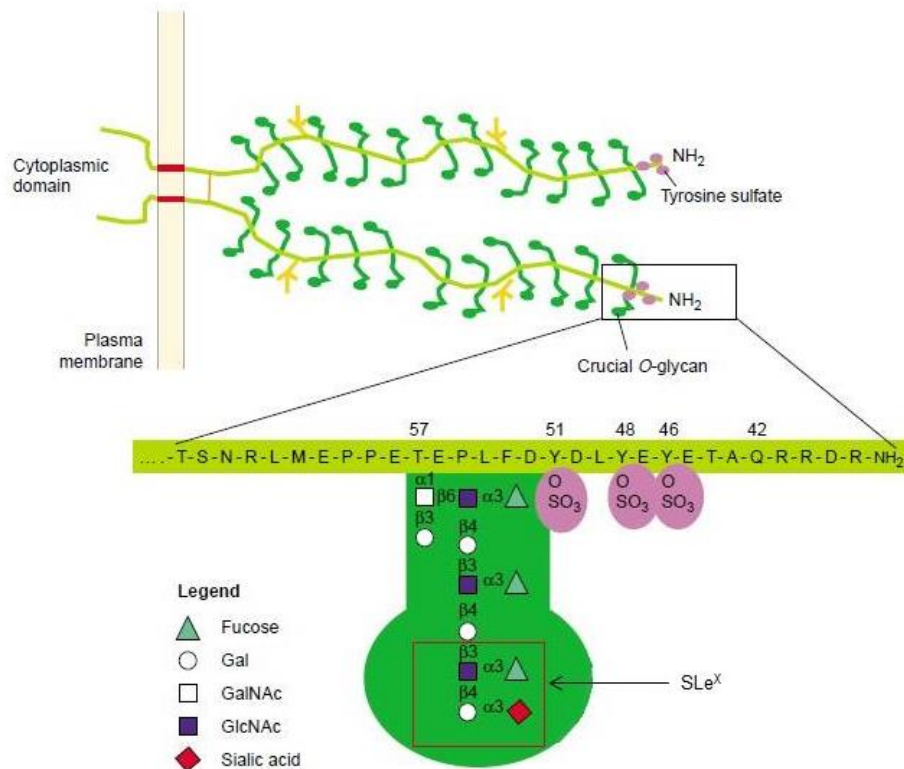
La P-sélectine (CD62P) est une molécule d'adhésion cellulaire faisant partie de la famille des sélectines regroupant les L (pour Leucocytes), E (pour Endothélium) et P-sélectines (P pour Plaquettes) [254]. Cette glycoprotéine joue un rôle dans le recrutement des leucocytes et lors du processus d'extravasation dans la réponse inflammatoire vasculaire [255, 256]. Elle est rapidement transloquée à la surface des plaquettes et de l'endothélium activés lors de stimuli inflammatoires faisant d'elle un marqueur pertinent pour l'imagerie moléculaire de l'inflammation vasculaire, des thromboses veineuses et artérielles, de l'athérosclérose ainsi que des épisodes d'ischémies transitoires [248, 257].

Le choix du ligand est primordial en imagerie moléculaire. Ce dernier doit avoir une forte affinité pour une cible unique et spécifique afin d'obtenir un diagnostic univoque et robuste. Par ailleurs, son temps de circulation dans le sang doit lui permettre d'atteindre sa cible avant d'être excrété ou métabolisé. Les ligands d'imagerie moléculaire peuvent être de différentes natures : anticorps, peptides, petites molécules mais aussi des polysaccharides comme l'héparine, les fucoïdanes ou le chitosane qui possèdent des propriétés de liaisons à des marqueurs biologiques [258].

La production d'anticorps et de protéines reste à l'heure actuelle onéreuse et présente des risques immunogéniques pour des applications chez l'homme. Malgré ces freins, des anticorps murins ont été utilisés dans le développement d'agents de contrastes à base de microparticules de fer ou de microbulles pour l'IRM et l'échographie [259, 260]. Des peptides obtenus par voie chimique et possédant une affinité pour la P-sélectine ont également été utilisés pour recouvrir des microparticules de fer pour le diagnostic de l'inflammation endothéliale post-AVC en IRM [261, 262].

Pour pallier aux problèmes de coûts et aux risques de réponses immunes, des ligands polysaccharidiques ont été développés. Notamment le Sialyl Lewis X (SLe<sup>X</sup>), un tétrasaccharide retrouvé sur le principal ligand naturel de la P-sélectine, la P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) qui est exprimée à la surface des leucocytes. De par son affinité pour la P-sélectine, le SLe<sup>X</sup> fut associé à un chélate de gadolinium pour diagnostiquer des lésions de la barrière hémato-encéphalique post-AVC [263] ou à des microbulles pour une utilisation en échographie [264]. Les fonctions hydroxyles du galactose et du fucose ainsi que la fonction acide carboxylique de l'acide sialique présentes sur le SLe<sup>X</sup> seraient responsables de la reconnaissance de la PSGL-1 par la P-sélectine (Figure 1.6) [265, 266].

Cependant, le SLe<sup>x</sup> ne possède une interaction forte avec la P-sélectine que lorsqu'il est associé aux groupements tyrosines sulfatées du PSGL-1 [267, 268].



**Figure 1.6** – Schéma du PSGL-1 et de son domaine responsable de l'interaction avec la P-sélectine, portant le SLe<sup>x</sup> (cadre rouge). Adapté de [248].

Le fucoïdane et le PSGL-1 présentent quelques similitudes structurales : le fucose, la fonction acide carboxylique du SLe<sup>x</sup> ainsi que les sulfates présents sur les tyrosines. Varki fût le premier à décrire l'affinité de certains polysaccharides sulfatés pour la P-sélectine. L'héparine, le sulfate d'héparane, le sulfate de dextrane mais surtout les fucoïdanes ont démontré une interaction avec la glycoprotéine en mimant l'action du SLe<sup>x</sup> [91]. Plus tard, Bachelet *et al.* ont mesuré les forces d'interaction de ces polysaccharides avec leur cible. Une FF de bas poids moléculaire (7,2 kDa) a montré une affinité de l'ordre de 1 nM alors que des héparines (5,7 kDa) ou des sulfates de dextrane (8 kDa) avaient des affinités beaucoup plus faibles, 577 nM et 118 nM respectivement [3]. Les fucoïdanes possèdent donc une très forte affinité pour la P-sélectine. L'approfondissement des relations structure-activité entre une FF reproductible et la P-sélectine a fait l'objet de notre attention lors de ce projet comme décrit dans le Chapitre 4 de ce manuscrit.



# *Chapitre 2*

---

## Matériels et Méthodes

---



## 2. Matériels et méthodes

---

### 2.1. Méthodes de caractérisation.

#### 2.1.1 *Détermination de la masse molaire par HPSEC-MALLS-dRI.*

Les masses molaires absolues et les distributions de masses molaires ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC) couplée à un détecteur de lumière diffusée multi-angles (MALLS) et un réfractomètre différentiel. La phase mobile, une solution de  $\text{NaNO}_3$  à 0,15M filtrée sur  $0,1\mu\text{m}$  (Millipore, Billerica, USA), est dégazée (Ultimate 3000 degasser, Thermo-Fischer, Villebon sur Yvette, France) et éluée à  $0,5\text{ml}/\text{min}$  (Ultimate 3000 pump, Thermo-Fischer, Villebon sur Yvette, France).  $100\mu\text{L}$  d'échantillon à environ  $20\text{mg}/\text{mL}$  sont filtrés sur  $0,2\mu\text{m}$  et injectés *via* un injecteur automatique (Ultimate 3000 autosampler, Thermo-Fischer, Villebon sur Yvette, France). Le pilotage de l'HPLC est assuré par le logiciel Chroméléon v6.8 (Thermo-Fischer, Villebon sur Yvette, France). La ligne SEC consiste en une colonne de garde OHPak SB-G suivie de deux colonnes, OHPak SB802.5 HQ et OHPak SB803 HQ en séries (Showa Denko Europe, Munich, Germany). La phase stationnaire est un gel de poly(hydroxyméthacrylate). Le détecteur MALLS, un DAWN HELEOS II (Wyatt Technology France, Toulouse, France) est équipée d'une cellule en silice et d'une diode laser Ga-As ( $\lambda = 666\text{nm}$ ). L'ensemble des données collectées (lumière diffusée (LS) et indice de réfraction différentiel (dRI)) est traité avec le logiciel ASTRA v6.1 (Wyatt Technology France, Toulouse, France). Les masses molaires sont calculées avec la méthode de Zimm à l'ordre 1. La concentration est mesurée en ligne avec un réfractomètre différentiel (IOTA 2, Precision Instruments, Marseille, France) en utilisant les valeurs d'incrément d'indice de réfraction ( $dn/dc$ ) mesurées préalablement. Chaque échantillon est analysé en triplicata.

#### 2.1.2 *Détermination de l'incrément d'indice de réfraction.*

Des solutions de concentrations connues de l'échantillon sont préparées dans  $\text{NaNO}_3$  0,15M et filtrées sur  $0,2\mu\text{m}$ . De 4 à 5mL de chaque concentration sont injectés dans le réfractomètre différentiel (IOTA 2, Precision Instruments, Marseille, France) dont la cellule de référence a préalablement été purgée avec la solution de  $\text{NaNO}_3$ . L'indice de réfraction différentiel (dRI) est enregistré à l'aide du logiciel ASTRA v6.1 (Wyatt Technology France, Toulouse, France). Les

solutions sont injectées par concentration croissante les unes à la suite des autres à l'aide d'une seringue connectée directement sur la cellule de mesure. Le graphique Concentration vs dRI est alors tracé et une régression linéaire permet d'obtenir la valeur de l'incrément d'indice de réfraction  $dn/dc$  de l'échantillon. La valeur de 0,144, obtenue en moyennant les valeurs de 10 échantillons, sera utilisée pour les calculs des masses molaires des fucoïdanes.

### 2.1.3 Détermination de la composition en monosaccharides.

→ Par dosage colorimétrique.

Les tests colorimétriques pour les dosages des taux de fucose et d'acides uroniques sont réalisés dans des plaques de culture de 96 puits. L'absorbance de chaque puits est relevée à l'aide d'un lecteur de plaques ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek, Colmar, France) et les données traitées avec le logiciel Gen-5 (BioTek, Colmar, France).

#### Dosage du fucose :

La détermination du taux de fucose est adaptée de la méthode de Dische [269]. Dans une plaque de 96 puits, 50 $\mu$ L de l'échantillon à environ 0,3 mg/mL sont mélangés à 200  $\mu$ L d'acide sulfurique concentré (18M). La plaque est laissée à l'étuve à 80°C pendant 30min puis mise à refroidir jusqu'à la température ambiante. 8 $\mu$ L de chlorohydrate de cystéine à 3% (p/v) sont alors ajoutés et la plaque est laissée pendant 1h à 4°C. L'absorbance de chaque puit est lue à 405 nm et 450 nm. L'absorbance propre au fucose est déterminée avec la relation suivante (DO = Densité Optique) :

$$DO_{\text{fucose}} = [DO_{405\text{nm}}(\text{puit}) - DO_{405\text{nm}}(\text{blanc})] - [DO_{450\text{nm}}(\text{puit}) - DO_{450\text{nm}}(\text{blanc})]$$

Le taux de fucose est alors déterminé à partir d'une courbe standard obtenue avec des solutions de L-fucose (25-500 $\mu$ g/mL) soumises au même procédé. Chaque échantillon est analysé en triplicata.

#### Dosage des acides uroniques :

La détermination du taux d'acides uroniques est adaptée de la méthode de Bitter et Muir [270]. Dans une plaque de 96 puits, 35 $\mu$ L de l'échantillon à environ 0,3 mg/mL sont mélangés à 200  $\mu$ L de tétraborate de sodium à 0,025M dans de l'acide sulfurique concentré (18M). La plaque est laissée à l'étuve à 80°C pendant 30min puis mise à refroidir jusqu'à la température ambiante. 14 $\mu$ L de carbazole à 0,15% (p/v) dans de l'éthanol sont alors ajoutés et la plaque est laissée pendant 1h à 80°C. L'absorbance de chaque puits est lue à 540nm. Le taux d'acides uroniques est alors déterminé à partir d'une courbe standard



obtenue avec des solutions d'acide glucuronique (25-500 $\mu$ g/mL) soumises au même procédé. Chaque échantillon est analysé en triplicata.

→ Par dérivation pré colonne HPLC.

La détermination de la composition en monosaccharides par dérivation pré colonne est adaptée de la méthode de Zhang *et al.* [271].

Matériel :

HPLC Dionex Ultimate 3000 avec détecteur UV (Thermo-Fischer, Villebon sur Yvette, France) et possibilité de faire des gradients de solvant. Colonne phase inverse CBM-20A YMC ODS-AQ 250x4,6mm, 5 $\mu$ m (YMC Europe GMBH, Dinslaken, Allemagne). Logiciel Chroméléon v6.8 (Thermo-Fischer, Villebon sur Yvette, France).

Préparation de la solution standard (SS) :

On pèse précisément 0,10mmol de ribose (15,0mg) que l'on dilue jusqu'à 10mL avec de l'eau dans une fiole jaugée.

Préparation de la solution de référence (SR) :

A 0,025mmol de mannose, acide glucuronique, glucose, galactose, xylose et fucose on ajoute alors 2,5mL de la solution standard puis on dilue jusqu'à 50mL avec de l'eau dans une fiole jaugée.

Préparation de la solution de 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one (MPP) :

CAS (MPP) : 89-25-8

Solution à 0,5M dans du méthanol.

**Tableau 2.1** – Préparation de la solution de référence, de la solution standard et de la solution de MPP.

	Composé	C (mmol/L)	n (mmol)	M (g/mol)	m (mg)	V (solution)
SR	Mannose	0,5	0,025	180,16	4,5	50mL H <sub>2</sub> O (dont 2,5mL de SS)
	Ac. Gluc.	0,5	0,025	194,14	4,9	
	Glucose	0,5	0,025	180,16	4,5	
	Galactose	0,5	0,025	180,16	4,5	
	Xylose	0,5	0,025	150,13	3,8	
	Fucose	0,5	0,025	164,16	4,1	
SS	Ribose	10	0,1	150,13	15,0	10mL H <sub>2</sub> O
	MPP	500	5	174,2	871,0	10mL MeOH

Préparation des échantillons :

6-8mg de fucoïdane (préalablement séchés une nuit à l'étuve à vide) sont dissouts dans 2mL d'acide trifluoroacétique 2M dans un tube blindé de 10mL. Le tube est scellé sous N<sub>2</sub> puis chauffé 4h à 110°C. On laisse le tube refroidir à température ambiante puis la solution est neutralisée à pH 7 avec NaOH 2M. 500µL de la solution standard sont ajoutées, la solution est bien agitée et diluée dans une fiole jaugée de 10mL.

→ **À partir de cette étape on réalise le même protocole pour la solution de référence.**

À 100 µL d'hydrolysate ou de SR, on ajoute 100µL d'une solution de MPP dans du MeOH à 0,5M et 100µL de NaOH 0,3M. La solution est incubée 30min à 70°C. La solution est alors refroidie à 8°C puis neutralisée (pH = [6,3 – 6,8]) avec HCl 0,3M (≈ 75-100µL). On ajoute 1mL de CHCl<sub>3</sub> à la solution, on agite vigoureusement puis on centrifuge à 4200 t/min pendant 10min à 6-8°C. On retire la couche inférieure de CHCl<sub>3</sub> et la phase aqueuse est extraite deux fois avec du CHCl<sub>3</sub>. La phase aqueuse est filtrée sur 0,2µm et est prête à être analysée.

Chromatographie :

Volume injecté : 100µL.

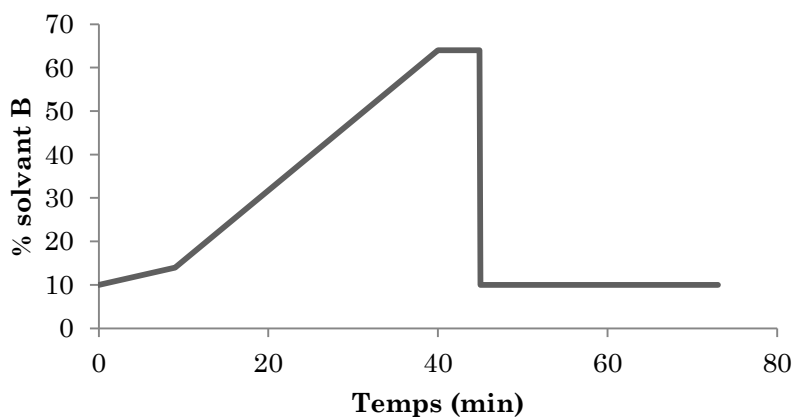
Débit de la phase mobile : 1mL/min.

Température : ambiante (20-25°C).

Solvant A : 0,4% triéthylamine dans un tampon acétate d'ammonium à 20mmol/L. Le pH est ajusté à 6,3 avec de l'acide acétique et de l'acétonitrile est ajouté (9 :1).

Solvant B : 0,4% triéthylamine dans un tampon acétate d'ammonium à 20mmol/L. Le pH est ajusté à 6,3 avec de l'acide acétique et de l'acétonitrile est ajouté (4 :6).

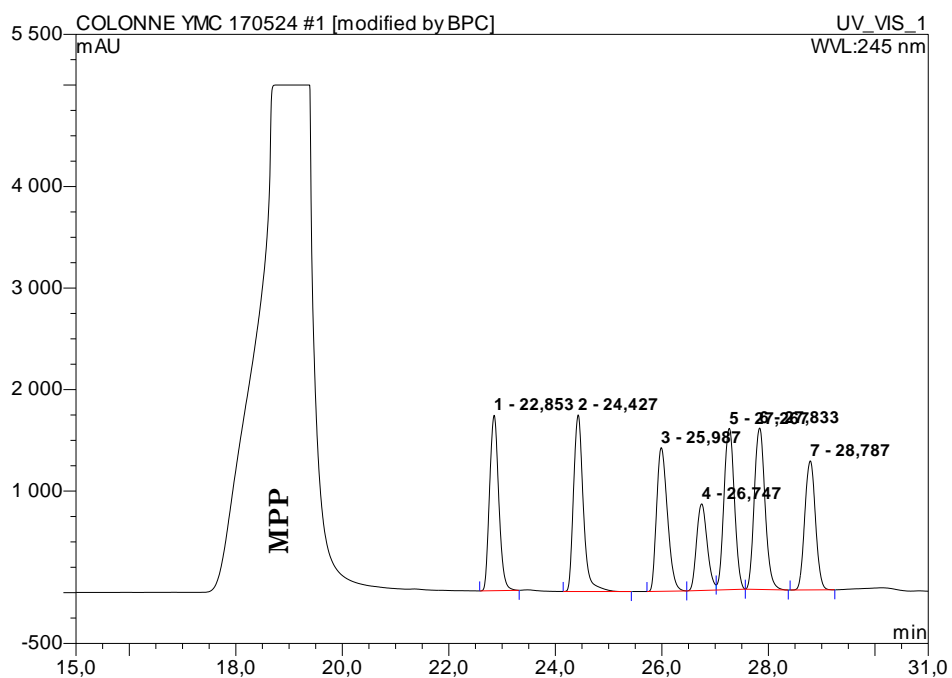
Gradient Solvant B : 10%–14% pendant 9min puis de 14% à 64% de la 9ème à la 40ème minute, 64% pendant les 5 minutes suivantes et retour à 10% tenu pendant 28min à 1 ml/min.



**Figure 2.1** – Gradient de solvant pour l'analyse de la composition en monosaccharides par dérivation pré colonne.

L'absorbance est mesurée à **245nm**. Chaque échantillon est analysé en triplicata.

La Figure 2.2 présente un chromatogramme d'une solution de référence.



**Figure 2.2** – Chromatogramme de la solution de référence. (1) mannose, (2) ribose, (3) ac. glucuronique, (4) glucose, (5) galactose, (6) xylose, (7) fucose.

Calculs :

Le facteur de correction  $f_{i/s}$  pour chaque monosaccharide est calculé avec l'équation ci-dessous :

$$f_{i/s} = (W_i/W_s) / (A_i/A_s)$$

Avec  $A_s$  = Aire du pic du ribose de la SR

$A_i$  = Aire du pic du monosaccharide standard dans la SR

$W_s$  = Quantité de ribose dans la SR

$W_i$  = Quantité du monosaccharide dans la SR

La quantité de chaque monosaccharide présent dans la solution de fucoidanes est calculée avec l'équation ci-dessous :

$$W = f_{i/s} (A_i/A_s) W_s$$

Avec  $A_s$  = Aire du pic du ribose de la solution de fucoidane

$A_i$  = Aire du pic du monosaccharide standard dans la solution de fucoidane

$W_s$  = Quantité de ribose dans la solution de fucoidane

$W$  = Quantité du monosaccharide dans la solution de fucoidane

$f_{i/s}$  = Facteur de correction du monosaccharide dosé.

#### 2.1.4 Détermination de la teneur en sulfates.

Le taux de sulfate est obtenu par le dosage du bleu de méthylène, formé après l'hydrolyse acide des échantillons, la réduction des sulfates ( $-\text{OSO}_3^-$ ) en sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ) puis par la formation de bleu de méthylène *in situ* avec la *N,N*-diméthyl-*p*-phénylène diamine. Le protocole est adapté des méthodes de Gustafsson [272] et Kuban *et al.*[273]. 50 à 100 $\mu\text{L}$  de l'échantillon sont ajoutés à 5mL d'une solution composée de 100mL d'acide iodhydrique concentré, 11mL d'acide acétique glacial et 10g d'hypophosphite de sodium. Le mélange est chauffé à reflux pendant 10min sous flux d'azote (200mL/min) pour entraîner le  $\text{H}_2\text{S}$  formé. Après lavage par barbotage dans l'eau, le  $\text{H}_2\text{S}$  est piégé sous forme de sulfure de zinc ( $\text{ZnS}$ ) à l'aide d'un mélange de 2,5mL d'acétate de zinc (0,5M) et d'acétate de sodium (0,1M) complété avec 12,5mL d'eau osmosée. Ensuite, 4mL d'une solution de sulfate d'ammonium de fer (III) ( $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ ) (16mM) dans de l'acide sulfurique (0,1M) et 1mL de *N,N*-diméthyl-*p*-phénylène diamine (3,7mM) dans de l'acide sulfurique (9M) sont ajoutés à la solution de  $\text{ZnS}$ . La solution est

maintenue à température ambiante 5min puis 5mL d'acide sulfurique sont ajoutés à la fiole. Le volume final est ajusté à 25mL avec de l'eau osmosée. La fiole est maintenue dans le noir pendant 20min et l'absorbance est mesurée à 665nm et 745nm avec un spectrophotomètre UV-visible (Lambda 12, Perkin-Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). La quantité de sulfure d'hydrogène, et donc de sulfates, est déterminée à partir d'une courbe standard obtenue de solutions de sulfates de potassium soumises au même procédé. Chaque échantillon est analysé en triplicata.

### 2.1.5 Dosage d'amines primaires.

Ce dosage permet de détecter de façon qualitative et quantitative la présence de fonctions amines libres primaires par réaction avec l'*o*-phtalaldéhyde.

#### Préparation de la solution tampon :

420 mg de NaHCO<sub>3</sub> sont dissouts dans 100mL d'eau osmosée puis le pH est ajusté à 10,8 avec du NaOH en poudre.

#### Préparation des réactifs :

Réactif A : 0,15mL de mercapto-éthanol sont mélangés à 29,85 de solution tampon.

Réactif B : 8mg d'*o*-phtalaldéhyde sont dilués dans 16mL d'eau et 4mL d'éthanol.

On ajoute 0,75mL de réactif A et 0,5mL de réactif B à 0,5mL d'une solution à 5mg/mL de l'échantillon à analyser. On laisse reposer 20min à température ambiante puis on enregistre le spectre UV-visible entre 280 et 400nm (Lambda 12, Perkin-Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). Un blanc composé de 0,5mL de l'échantillon, 0,75mL de réactif A, 0,4mL d'eau osmosée et 0,1mL d'éthanol (sans *o*-phtalaldéhyde) est réalisé avant chaque mesure. Une gamme étalon ayant subi le même protocole est réalisée avec des solutions de bromopropylamine entre 0 et 1,5μmol/mL. Les valeurs d'absorbance maximale sont relevées et une droite d'étalonnage est tracée. La valeur d'absorbance à la même longueur d'onde des échantillons permet de calculer la quantité de NH<sub>2</sub> contenu dans chaque solution de polymère mesurée une fois le blanc soustrait. À partir de la masse molaire du polymère analysé, la quantité de NH<sub>2</sub> par chaîne de polymère peut être déterminée.

### 2.1.6 Détermination de la teneur en cendres.

Un creuset propre est calciné à 800°C pendant 1h. On laisse le creuset refroidir à température ambiante dans un dessiccateur pendant au minimum 1h et on règle la température du minéralisateur à 600°C. Le creuset est pesé et sa tare noté T. On pèse exactement environ 1g de produit sec à analyser. Le produit est introduit dans le creuset, on note sa masse M1. Le creuset est placé sur la partie supérieure du minéralisateur pendant au minimum 1h (correspondant à une température d'environ 260°C) pour retirer les traces éventuelles d'humidité. On place ensuite le creuset à l'intérieur du minéralisateur pendant 6-7h. Le creuset est refroidit dans un dessiccateur pendant au minimum 1h. On pèse une première fois le creuset et on note sa masse M2. Le creuset est replacé dans le minéralisateur pendant 6-7h puis refroidit. On pèse le creuset une deuxième fois et on note sa masse M3. Si la différence entre M2 et M3 est inférieur à 0,015g, la minéralisation est terminée, sinon, on poursuit la calcination jusqu'à obtenir une différence inférieur à 0,015g. Le pourcentage de cendres totales est calculé avec l'équation suivante :

$$\%CT = (M3-T) / M1 * 100$$

### 2.1.7 Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FT-IR).

Les spectres sont enregistrés entre 400 cm<sup>-1</sup> et 4000 cm<sup>-1</sup> avec un spectromètre à Transformée de Fourier AVATAR 370 (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) et représentent la somme de 32 scans/échantillon avec une résolution de 2cm<sup>-1</sup>. Environ 2mg d'échantillons secs sont mélangés à environ 100mg de bromure de potassium. La poudre est alors compressée pour former une pastille à environ 2% (p/p) de produit à analyser. Les spectres sont traités avec le logiciel OMNIC v6.1 (Thermo Scientific).

### 2.1.8 Spectroscopie Infra-Rouge par Réflexion Totale Atténuée (IR-ATR).

Les spectres sont enregistrés entre 600 cm<sup>-1</sup> et 4000 cm<sup>-1</sup> avec un spectromètre Vertex 70 (BioSpin Bruker, Wissembourg, France) équipé d'un cristal ATR en diamant synthétique déposé sur une lentille de KRS5 (Bromo-iodure de Thallium) et d'un détecteur MCT (Mercure-Cadmium-Tellure) refroidi à l'azote liquide. L'échantillon est placé sur le diamant ATR sous presse sur une platine Miracle Pike (PikeTech, Madison, États-Unis). Les spectres sont traités avec le logiciel OPUS v6.5 (BioSpin Bruker, Wissembourg, France).

### 2.1.9 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Les spectres RMN ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Bruker AVANCE III (BioSpin Bruker, Wissembourg, France) à 500 MHz avec une sonde de détection de 5mm et à une température de 300K. Un échange H → D est d'abord réalisé sur les échantillons en réalisant 4 à 5 cycles de solubilisation – lyophilisation avec du D<sub>2</sub>O, 99,96%. Enfin, l'échantillon est dissout dans 700µL de D<sub>2</sub>O pour être analysé. Les spectres <sup>1</sup>H représentent la somme de 64 scans avec une largeur spectrale de 5000Hz. Une longueur d'impulsion de 9,5µs et un délai de 1s ont été utilisés. Le signal de l'eau a été supprimé en utilisant une séquence de présaturation à la fréquence de résonance de l'eau.

### 2.1.10 Spectrométrie de masse.

Les dérivés préparés sont séparés et détectés par chromatographie liquide ultra performance à polarité de phase inverse sur un système UHPLC couplée à un spectromètre de masse haute résolution utilisant l'électronébulisation comme mode d'ionisation suivi d'un temps de vol avant la détection : UPLC-HRMS (ACQUITY UPLC® et SYNAPT® G2 High Definition MS™ mass spectrometer, Waters, Manchester, UK). Les analyses ont été conduites sur une colonne CSH® C18 1.7 µm (2.1 x 100 mm) thermostatée à 40°C. Les données ont été collectées en mode positif (ESI+). Les paramètres d'électronébulisation étaient les suivants : température de la source 120°C, température de désolvatation 550°C, débit d'azote au niveau du cône 20L/h, débit d'azote pour la désolvatation 1000L/h et tension de capillaire 3kV. Les spectres de masses ont été enregistrés en mode centroïde sur une étendue de m/z allant de 50 à 1000. Une résolution de masse de 21,500 définie à m/z 500 est attendue. La leucine enképhaline est utilisée comme étalon interne (Lock-Spray™) pour corriger les valeurs m/z mesurées (exactitude des mesures < 5 ppm).

## **2.2. Méthodes de fractionnement.**

### *2.2.1 Par chromatographie d'échange d'ions basse pression (IEC).*

Les échantillons de fucoïdanes sont élués sur une résine de cellulose-DiEthylAminoEthanol (DEAE) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les taux de fucozes et d'acides uroniques des fractions sont déterminés par dosages colorimétriques.

La résine de cellulose-DEAE est mise en suspension dans l'eau et laissée à gonfler pendant 30min sous légère agitation. Elle est ensuite rincée sur fritté avec deux fois son volume d'eau puis deux fois son volume de tampon acétate de sodium (4M, pH = 5,0) et enfin cinq fois son volume de tampon acétate de sodium (0,5M, pH = 5,0). La résine est alors versée dans une colonne Spectra/Chrom® (Spectrum® Chromatography, Houston, États-Unis) de 5cm de diamètre interne et de 30cm de haut, jusqu'à obtenir environ 20cm de résine tassée. Un piston est ensuite placé au sommet de la colonne et positionné à environ 1cm de la résine. La colonne est alors mise en circulation à l'aide d'une pompe péristaltique (MINIPLUS 3, Gilson, Villiers-Le-Bel, France) à un débit de 0,3 – 0,4 mL/min pendant une nuit minimum.

Environ 1g d'échantillon est solubilisé dans 10mL de phase mobile (acétate de sodium, 0,5M, pH = 5,0). La solution est injectée au sommet de la colonne, le débit de la pompe augmenté à 0,8mL/min et les tubes de 8mL sont collectés en sortie de colonne. Après avoir collecté 30 tubes, la phase mobile est remplacée par une solution d'acétate de sodium 0,5M et NaCl 2M tamponnée à pH = 5,0. 40 tubes sont ensuite collectés. La colonne est rééquilibrée avec une solution d'acétate de sodium 0,5M pH= 5,0 pendant une nuit minimum avant d'injecter un nouvel échantillon. Les fucozes et les acides uroniques sont dosés dans un tube sur deux puis les chromatogrammes en absorbance des fucozes et des acides uroniques sont tracés afin d'identifier les deux fractions. Les tubes de chaque fraction sont alors regroupés et les solutions sont dialysées cinq fois contre de l'eau à l'aide de boudins de dialyse (membrane en cellulose régénérée, MWCO 1kDa, Spectra/Por, Spectrum Labs). Les solutions sont alors lyophilisées (COSMOS, Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France) pour obtenir deux fractions.



### 2.2.2 Par chromatographie d'exclusion stérique préparative basse pression (SEC).

Les échantillons de fucoïdanes sont élués sur un gel permettant une séparation des masses de 3000g/mol à 60000g/mol (Gel P-60, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Le gel est mis en suspension dans une solution de NaCl 0,15M et 0,02% d'azide (p/v) préalablement filtrée et dégazée. Le gel est laissé au repos une nuit puis coulé dans une colonne préparative XK 50/60 (GE Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) de 5cm de diamètre interne et de 60cm de haut. Le gel est laissé au repos une nuit. Une pompe péristaltique (MINIPLUS 3, Gilson, Villiers-Le-Bel, France) est placée en sortie de colonne pour maintenir un débit d'élution de 1,5mL/min. Le volume mort a été déterminé à l'aide de dextrane bleu ( $2 \times 10^6$ g/mol, GE Life Sciences, France) et de fluorescéine (332g/mol, Sigma-Aldrich) co-injectés sur la colonne.

Environ 10g de fucoïdanes sont solubilisés dans 30mL de phase mobile, injectés sur la colonne et élués à 1,4mL/min. Des tubes de 8mL sont collectés en sortie de colonne entre le volume mort et le volume total. Les tubes sont regroupés en 7 fractions, dialysés cinq fois contre de l'eau à l'aide de boudins de dialyse (membrane en cellulose régénérée, MWCO 1kDa, Spectra/Por, Spectrum Labs) puis lyophilisés (COSMOS, Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France).

## **2.3. Méthodes de Purification.**

### *2.3.1 Purification par traitement basique.*

Les fucoïdanes sont dissouts dans de l'eau pour obtenir une solution à 16% (p/v). Le pH est alors ajusté à 10 à l'aide de NaOH 10M, un précipité/trouble se forme alors dans la solution. La solution est laissée à décanter une nuit à 4°C puis elle est centrifugée 15min à 4500tr/min (Allegra X-15R, Beckman-Coulter France, Villepinte, France). Le surnageant est récupéré, neutralisé avec HCl 2M puis dialysé 5 fois contre de l'eau osmosée (membrane en cellulose régénérée, MWCO 1kDa, Spectra/Por, Spectrum Labs). Les solutions sont alors lyophilisées (COSMOS, Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France).

### *2.3.2 Purification par ultrafiltration.*

#### Eléments du système :

Pompe péristaltique Masterflex I/P avec tête Easy Load I/P (MasterFlex, Gelsenkirchen, Allemagne) et tuyau silicone STA-PURE Series® PCS (9,5mm diamètre interne, 3,2mm épaisseur) (Gore, Newark, États-Unis) pouvant être remplacé par un tuyau Tygon B-44-3 de mêmes dimensions.

Cassette de filtration Millipore Pellicon 3 (Ultracel 3kD, surface 0,11m<sup>2</sup>, screen type C) sur support mini-holder Pellicon 2 (Millipore, Billerica, USA).

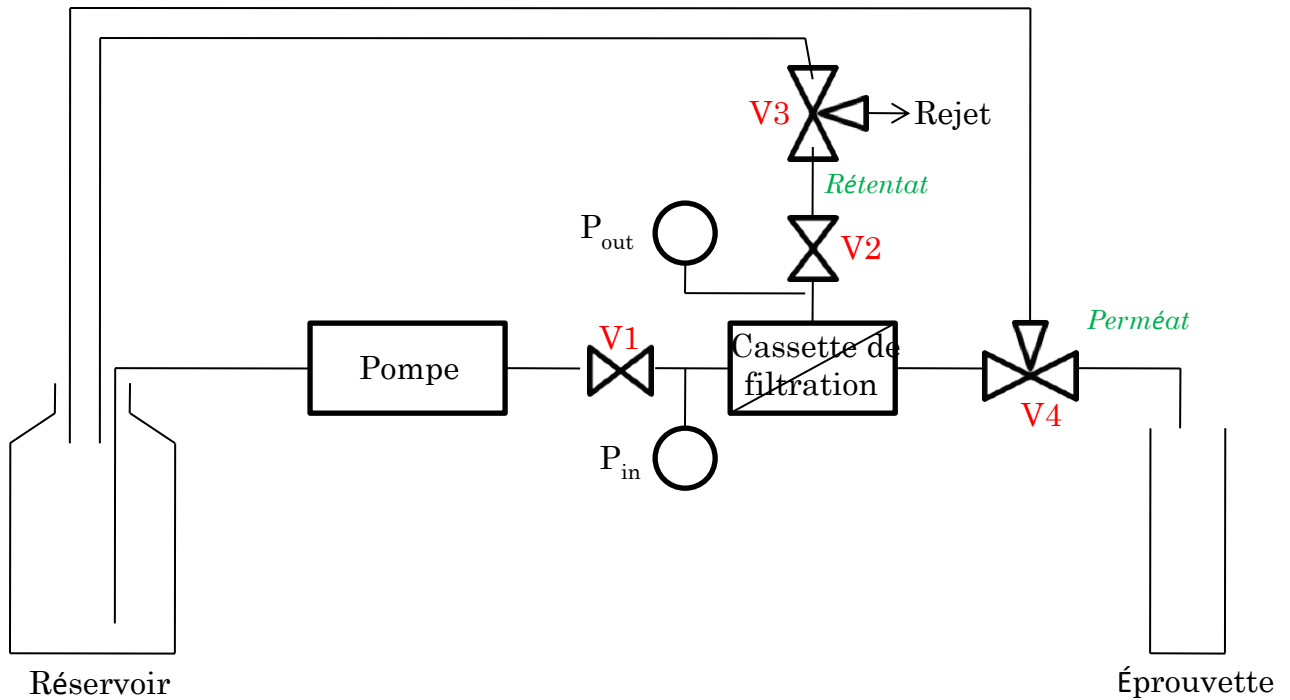
2 vannes 2 voies : vanne V1 sur la ligne d'alimentation et vanne V2 sur la ligne du rétentat.

2 vannes 3 voies permettant de recycler ou d'évacuer le rétentat (vanne V3) ou le perméat (vanne V4).

Réservoir d'alimentation : fiole fourneau de 3L.

Tubes en silicone Masterflex 9,5mm diamètre interne (longueur totale environ 1,30m).

2 manomètres donnant la pression d'alimentation ( $P_{in}$ ) et la pression du rétentat ( $P_{out}$ ).



**Figure 2.3** – Schéma du montage d’ultrafiltration.

Maintenance pré-utilisation :

Rinçage du système : faire passer 5L d’eau osmosée dans le circuit (pompe à environ 37,5L/h, TMP environ 1bar) rétentat et perméat étant rejetés à l’évier). Vider les tuyaux autant que possible en faisant tourner la pompe à l’envers.

Lavage du système : Introduire 2L d’hydroxyde de sodium à 0,1M dans le réservoir et faire tourner avec les mêmes paramètres en recyclage total (rétentat et perméat) pendant 30 minutes. Vider les tuyaux autant que possible en faisant tourner la pompe à l’envers.

Test de perméabilité : faire passer 5L d’eau osmosée avec les mêmes paramètres en rejetant rétentat et perméat. Mesurer la température de l’eau dans le réservoir (+/- 3°C de la température ambiante) ainsi que le débit de perméat. Le calcul de la NWP (Normalized Water Permeability) permet de déterminer l’efficacité de la procédure de nettoyage:

$$NWP = (Q_p * F) / (A * TMP)$$

- Avec :
- $Q_p$  = débit de perméat en L/h
  - F = facteur de correction de température
  - A = surface de la cassette de filtration en m<sup>2</sup>
  - TMP = pression transmembranaire en bar

Si la valeur de la NWP chute, cela indique un problème avec la procédure de nettoyage ou un encrassement de la cassette de filtration.

Tableau du facteur de correction de température F en fonction de la température :

**Tableau 2.2** – Facteur de correction F en fonction de la température.

T(°C)	F
15	1.276
16	1.243
17	1.212
18	1.181
19	1.152
20	1.125
21	1.098
22	1.072
23	1.047
24	1.023
25	1.000
26	0.978
27	0.956
28	0.935
29	0.915
30	0.896

Maintenance post-utilisation :

Rinçage : faire passer 2L d'hydroxyde de sodium à 0,1M en rejetant rétentat et perméat (pompe à environ 37,5L/h, TMP environ 1bar).

Lavage du système : Introduire 2L d'hydroxyde de sodium à 0,1M dans le réservoir et faire tourner avec les mêmes paramètres en recyclage total (rétentat et perméat) pendant 30 minutes. Vider les tuyaux autant que possible en faisant tourner la pompe à l'envers.

Test de perméabilité : idem maintenance pré-utilisation.

Mise en stand-by : remettre 2L de soude 0.1M dans le réservoir et faire circuler en recyclage total pendant 5 min (pompe à environ 37,5L/h, TMP environ 1bar). Puis stopper la pompe.

Protocole d'ultrafiltration :

Après avoir effectué la maintenance pré-utilisation, 2L de la solution de fucoïdanes à 2-10g/L à traiter sont placés dans le réservoir. Le pH et la conductivité sont mesurés. La pompe est mise en marche à environ 37,5L/h avec la vanne V3 (rétentat) en position recyclage et la vanne V4 (perméat) en position

rejet et les vannes V1 et V2 ouvertes. Le perméat est collecté dans une éprouvette graduée de 1L. La vanne V2 est fermée progressivement afin d'augmenter la pression sur la ligne de rétentat jusqu'à obtenir une  $P_{in} = 2,1\text{bar}$  et  $P_{out} = 1,9\text{bar}$  (TMP = 2bar) pour un débit de perméat d'environ 2L/h. Lorsqu'un litre de perméat a été collecté, la vanne V4 (perméat) est mise en position recyclage. Un litre d'eau osmosée est ajoutée au réservoir. Après une minute en recyclage total, la conductivité, le pH et le débit de perméat sont mesurés. La conductivité doit diminuer tout au long de la filtration, le pH diminue également mais il ne doit pas descendre en dessous de pH = 6,5, le débit de perméat doit rester stable. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que 4L de perméat aient été éliminés (nombre de diavolume = 2), la pompe est alors mise en circulation inversée pendant quelques instants pour récupérer la solution restant dans le support de la cassette de filtration ainsi que dans les parties recyclage du rétentat et du perméat. On réalise enfin la maintenance post-utilisation. La solution ultrafiltrée est alors lyophilisée (COSMOS, Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France).

## **2.4. Modifications chimiques des fucoïdanes.**

### *2.4.1 Amination réductrice.*

L'amination réductrice des fucoïdanes est adaptée de la méthode décrite par Kondo *et al.* [274] et Seo *et al.* [275].

#### Préparation des réactifs :

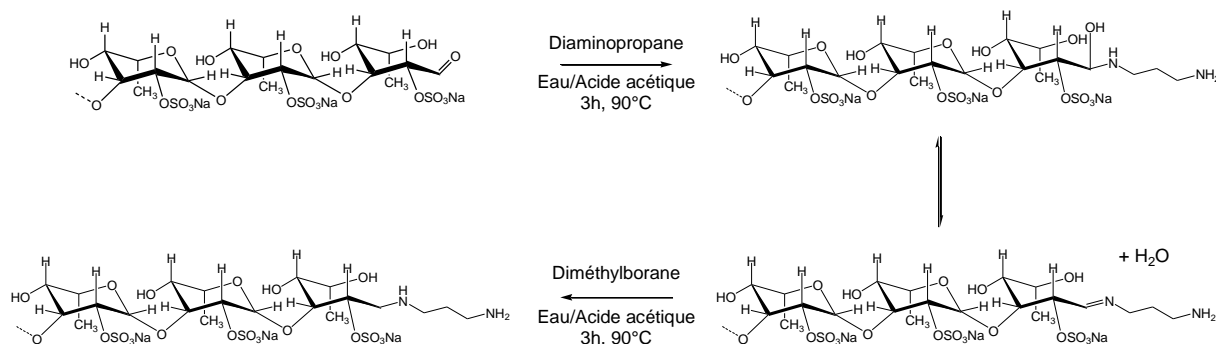
Solution de 1,3-diaminopropane 1,5M dans de l'eau/acide acétique glacial : on verse dans une fiole jaugée de 10mL, 5mL d'eau osmosée puis 3,750mL d'acide acétique glacial et enfin 1,250mL de 1,3-diaminopropane au goutte à goutte.

Solution de diméthylborane 3M dans de l'acide acétique glacial : 883,8mg de diméthylborane sont dissouts dans 5mL d'acide acétique glacial.

Tampon carbonate pH = 9,6 + NaCl 1M : 19,1g de NaHCO<sub>3</sub> sont dissouts dans 5L d'eau osmosée. 292,2g de NaCl sont ajoutés et le pH est ajusté à 9,6 avec NaOH en paillettes.

Solution d'eau/éthanol (80/20) + NaCl 0,5M : 1L d'éthanol est ajoutée à 4L d'eau osmosée puis 146,1g de NaCl sont ajoutés.

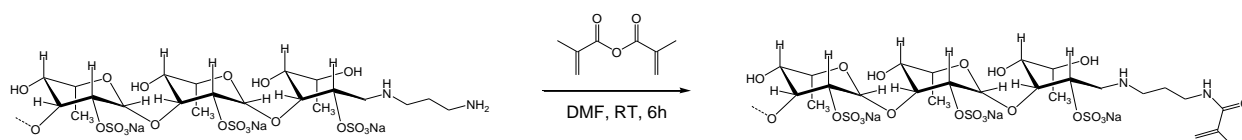
500mg de fucoïdane séchés une nuit à l'étuve à vide sont introduits dans un tube blindé de 10mL. 5,4mL d'une solution de 1,3-diaminopropane à 1,5M sont ajoutés. Le tube est scellé puis chauffé 3h à 90°C. Le tube est alors refroidi à température ambiante puis 1,4mL d'une solution de diméthylborane 3M dans de l'acide acétique glacial sont ajoutés. Le tube est à nouveau chauffé 90°C pendant 3h. Le tube est refroidi à température ambiante et neutralisé. La solution est alors dialysée cinq fois contre une solution de tampon carbonate à pH = 9,6 puis cinq fois contre une solution d'eau/éthanol et enfin cinq fois contre de l'eau osmosée (membrane en cellulose régénérée, MWCO 1kDa, Spectra/Por, Spectrum Labs). La solution est alors lyophilisée pour obtenir le produit sous forme d'une mousse beige (COSMOS, Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France). Le taux d'amination est déterminé par dosage colorimétrique d'amines primaires.



**Figure 2.4** – Amination réductrice de fucoïdanes.

### 2.4.2 Méthacrylation.

100 mg de fucoïdane aminé séchés une nuit à l'étuve à vide sont placés dans un ballon de 25 mL sous  $N_2$ . On ajoute 4 mL de DMF anhydre puis on place le ballon dans un bain à ultrasons pour mettre les fucoïdanes en suspension. On ajoute alors goutte à goutte 0,375 mL d'une solution d'anhydride méthacrylique à 0,1M dans du DMF anhydre. On agite vigoureusement pendant 6h à température ambiante. La solution est alors dialysée cinq fois contre une solution de tampon carbonate à  $pH = 9,6$  puis cinq fois contre de l'eau osmosée (membrane en cellulose régénérée, MWCO 1kDa, Spectra/Por, Spectrum Labs). La solution est alors lyophilisée pour obtenir le produit sous forme d'une mousse beige (COSMOS, Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France).

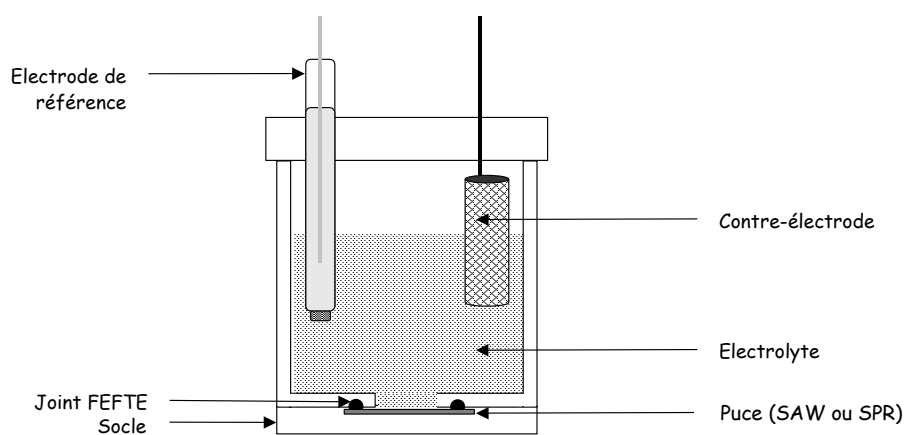


**Figure 2.5** – Méthacrylation de fucoïdanes.

### 2.4.3 Greffage électrochimique des fucoïdanes modifiés par polymérisation radicalaire électro-amorcée.

Les fucoïdanes méthacrylés sont greffés sur les puces de SAW ou de SPR par polymérisation radicalaire électro-amorcée. La méthode électrochimique utilisée est la voltampérométrie cyclique qui consiste à appliquer une rampe de potentiel ( $+0,5V \rightarrow -1,5V$ ) à une vitesse de balayage  $v = 50 \text{ mV/s}$  constante, partant, en général d'un potentiel où aucune réaction n'a lieu, pour ensuite atteindre un potentiel où une réaction d'oxydo-réduction a lieu à l'électrode. De

même, un balayage retour jusqu'au potentiel initial est effectué. 10 cycles sont ainsi réalisés. Les mesures électrochimiques sont réalisées dans une cellule à trois électrodes (Figure 2.6). Les puces de SAW ou SPR sont utilisées comme électrodes de travail. Chaque voie est isolée par un joint formant ainsi un compartiment (uniquement pour les puces SAW). Le contact avec la puce est réalisé à l'aide d'un papier de carbone. Une électrode Ag/AgNO<sub>3</sub> (fil d'argent poli couvert de nitrate d'argent) est utilisée comme électrode de référence. Enfin, une plaque de platine sert d'électrode auxiliaire (contre-électrode). L'électrolyte est composé de 50 µL d'une solution de fucoïdane méthacrylé à environ 7 mM et de 50 µL de 4-Nitrobenzenediazoniumtetrafluoroborate (NBD) à 20 µM dans de l'eau.



**Figure 2.6** – Schéma de la cellule électrochimique.



## **2.5. Tests d'affinité avec la P-sélectine.**

### *2.5.1 Par onde acoustique de surface (SAW).*

L'appareil utilisé est un SAM5 Blue (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Allemagne). Le SAM5 est tout d'abord rincé pendant 30 min avec de l'eau MilliQ. La puce est ensuite installée et le système (circuit fluidique et puce) est rincé par de l'HBS, préalablement dégazé pendant 30 min aux ultrasons, pendant 1h30 afin que le système s'équilibre. Les sélectines sont injectées successivement en concentrations croissantes, avec, entre chaque niveau de concentration, une régénération de la surface à l'aide d'une solution de SDS 5% w/v. Le temps de contact entre la puce et les sélectines, et entre la puce et la solution de régénération est de 3 min et 1 min respectivement, à un débit de 20 $\mu$ L/min.

### *2.5.2 Par résonnance plasmonique de surface (SPR).*

L'appareil utilisé est un Biacore X100 (GE HealthCare Europe, GmbH, Freiburg, Allemagne). Le Biacore est tout d'abord rincé pendant 30 min avec de l'eau MilliQ. La puce est ensuite installée et le système (circuit fluidique et puce) est rincé par un tampon PBS + Tween 20 0,01% (w/v) pendant une nuit afin que le système s'équilibre. Les sélectines sont injectées successivement en concentrations croissantes, avec, entre chaque niveau de concentration, une régénération de la surface à l'aide d'une solution de SDS 5% w/v puis de l'eau. Le temps de contact entre la puce et les sélectines, entre la puce et la solution de régénération et entre la puce et l'eau est de 3 min, 12 sec et 3 min respectivement, à un débit de 30 $\mu$ L/min.



# *Chapitre 3*

---

Production d'un fucoïdane de grade  
pharmaceutique à partir  
d'Ascophyscient®

---



### 3. Production d'un fucoïdane de grade pharmaceutique à partir d'Ascophyscient®

---

L'utilisation des fucoïdanes en médecine ne peut être légitimée que par une stratégie basée sur des matériaux de départ reproductibles. Cette stratégie peut être réalisée en suivant deux voies : (i) la validation d'une production industrielle à partir d'extraits naturels ; ou (ii) la synthèse totale à l'aide d'enzymes ou de réactions chimiques. Bien que des progrès significatifs aient été réalisés concernant la deuxième stratégie [59-61], l'extraction à partir d'organismes vivants reste la seule méthode employée aujourd'hui pour isoler des fractions polysaccharidiques bioactives.

Cependant, les difficultés rencontrées pour obtenir des caractéristiques physico-chimiques reproductibles d'un lot à l'autre empêchent le développement d'une fraction de fucoïdane utilisable par l'industrie pharmaceutique [195].

Dans ce contexte, un laboratoire commun a été créé entre la société Algues & Mer et le LVTS pour sécuriser la production de fucoïdanes de bas poids moléculaire (LMWF) commercialisés sous le nom d'Ascophyscient®. Ces composés ont été employés dans le cadre du développement d'un agent de contraste pour l'imagerie TEMP de l'athérombose [196, 198, 200, 235]. En 2015, ils ont été labellisés « matière première à usage pharmaceutique » (MPUP) par l'ANSM, ouvrant la voie à un large éventail d'applications cliniques.

De nombreux protocoles ont été décrits dans la littérature pour l'extraction de fucoïdanes à partir d'algues brunes [16, 204, 212, 244], chaque méthode influence la composition finale des fucoïdanes qui restent un mélange complexe d'espèces macromoléculaires [16, 19]. A&M a développé et optimisé un procédé d'extraction sans solvant dans des conditions douces à partir de l'algue brune *Ascophyllum nodosum*, suivi d'une dépolymérisation oxydo-réductrice (DOR) à l'aide de peroxyde d'hydrogène pour produire des lots de fucoïdanes reproductibles (Figure 3.1). Dans cette étude, nous avons analysé dix lots de LMWF de 2012 à 2017. La composition en monosaccharides, le taux de sulfate, la distribution des masses molaires, l'analyse élémentaire, la spectroscopie IR ainsi que l'analyse des cendres sont présentés pour une caractérisation totale et pour attester de la reproductibilité des LMWF produits par la société A&M.

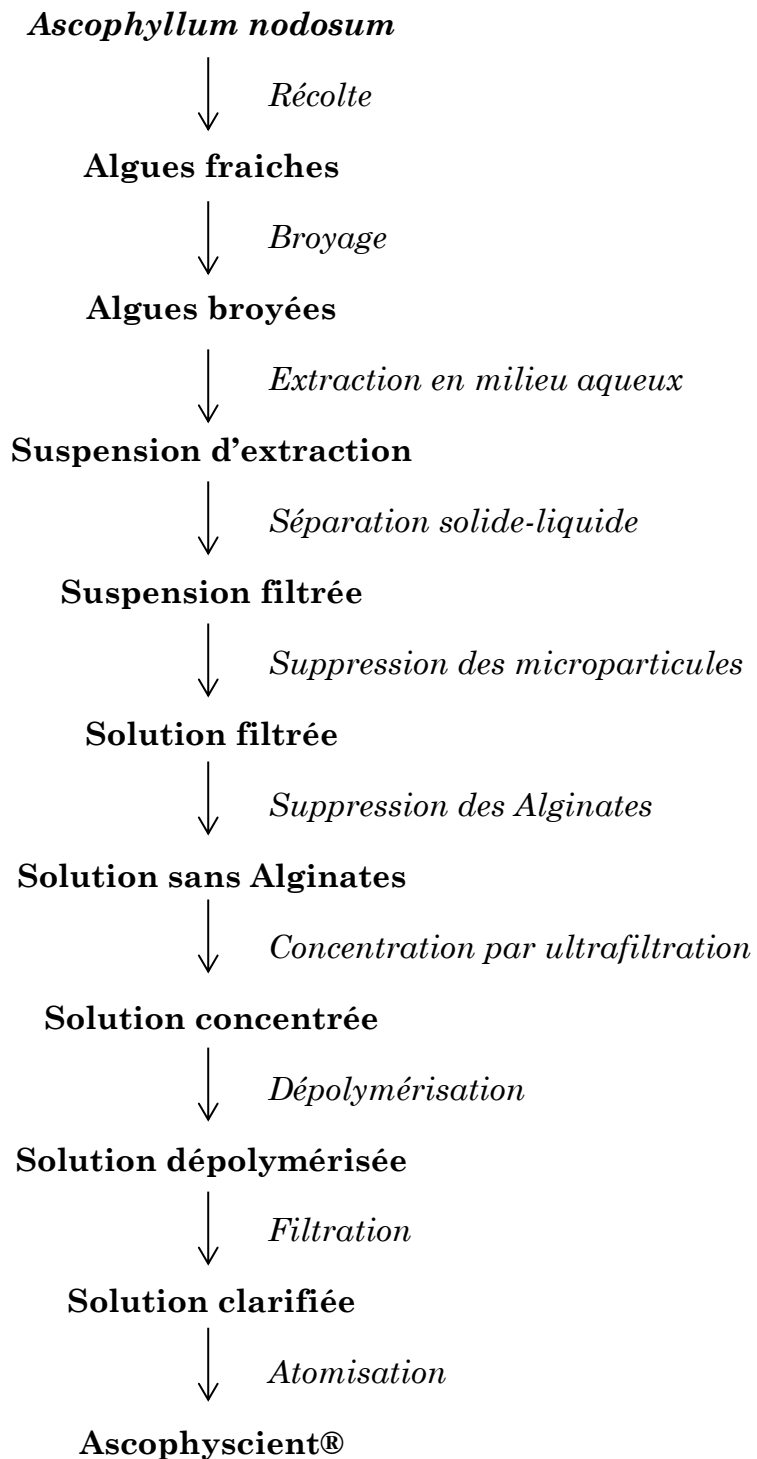


Figure 3.1 – Procédé de production d'Ascophyscient® développé par A&M.

### 3.1. Étude de la reproductibilité d'Ascophyscient®

La période de récolte de l'algue peut jouer un rôle sur la composition chimique des fucoïdanes extraits en raison du temps d'exposition au soleil ou de la température de l'eau entre autres [276]. Pour cette étude, les dix lots d'Ascophyscient® analysés provenaient d'algues récoltées à différentes périodes de l'année entre 2012 et 2017.

**Tableau 3.1** – Période de récolte des dix lots analysés.

Lot	Date de récolte
1	05/2012
2	08/2012
3	09/2012
4	06/2013
5	10/2013
6	05/2014
7	05/2015
8	09/2015
9	11/2016
10	01/2017

#### 3.1.1 *Masse molaire*

La masse molaire et la distribution des masses molaires des fucoïdanes sont des caractéristiques critiques en relation avec leurs propriétés biologiques. L'exemple le plus marquant est la propriété pro/anti-angiogéniques des fucoïdanes qui dépend directement de leur masse molaire comme en témoignent les travaux de Ustyuzhanina *et al.* [17].

Les déterminations des masses molaires des fucoïdanes et leurs distributions ont été réalisées en couplant une chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC) à un détecteur multi-angle de lumière laser diffusée (MALLS ou plus simplement LS) et à un réfractomètre différentiel (dRI). Il s'agit de la méthode de référence pour déterminer les masses molaires de polymères qu'ils soient naturels ou synthétiques. Cette méthode est absolue, elle ne nécessite pas d'étalonnage préalable des colonnes avec des polymères étalons de dimensions connues. Le détecteur de lumière, le réfractomètre et l'incrément d'indice de réfraction ( $dn/dc$ ) permettent de mesurer la masse molaire des fractions ainsi que d'obtenir des informations sur leur distribution. L'incrément d'indice de réfraction ( $dn/dc$ ) est un paramètre essentiel car il intervient en

inverse du carré dans les équations (formalisme de Debye-Zimm) permettant la détermination de la masse moyenne en poids  $\overline{M_w}$  :

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c \quad \text{Où } K \text{ est un paramètre optique égal à } 4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 / (\lambda_0^4 N_A)$$

$M_w$  est la masse molaire moyenne en poids en g/mol.

$c$  est la concentration de l'échantillon en g/mL.

$A_2$  est le deuxième coefficient virial.

$n$  est l'indice de réfraction du solvant.

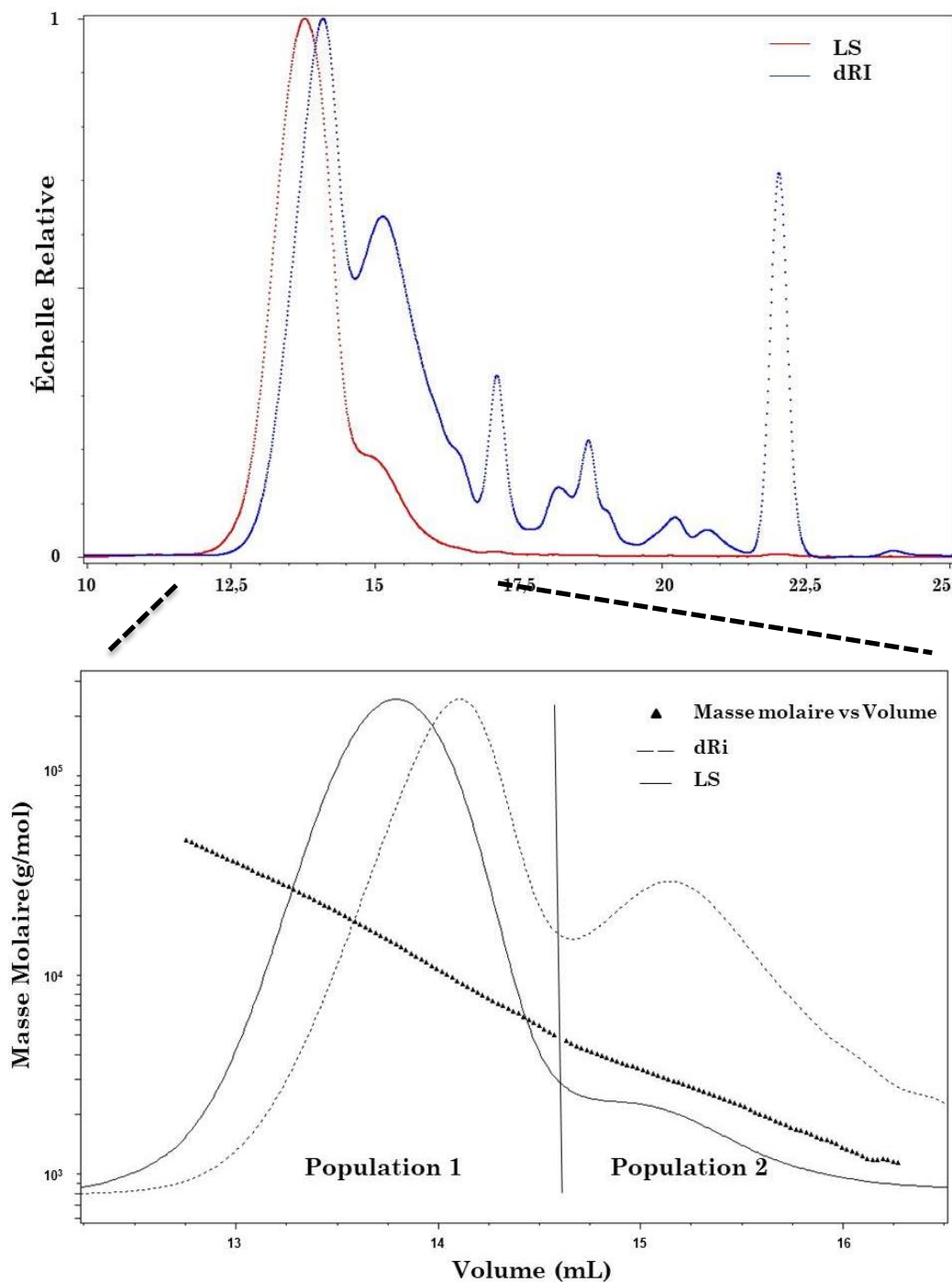
$R$  et  $P$  sont des facteurs liés à la lumière diffusée à l'angle ( $\theta$ ).

$\lambda_0$  est la longueur d'onde de la lumière diffusée dans le vide (cm).

$N_A$  est le nombre d'Avogadro.

Une faible variation de l'incrément d'indice de réfraction modifie donc grandement les valeurs obtenues. Le chromatogramme du lot 1 (LS et dRI) ainsi que le profil des masses molaires sont présentés sur la Figure 3.2. Tous les autres lots présentent des profils similaires.





**Figure 3.2** –Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 1.

Le profil réfractométrique (en bleu) est composé de deux pics principaux à  $V_1 = 13,5$  mL et  $V_2 = 15,5$  mL qui se recouvrent partiellement. Ces deux populations macromoléculaires sont suivies par des populations de plus faibles masses molaires ( $V > 16,5$  mL) composées d'oligosaccharides (sous-produits de la dépolymérisation radicalaire). On peut également apercevoir un pic intense à  $V_3$

= 22 mL correspondant aux sels présents dans la phase mobile et dans le produit. Le pic principal du profil de lumière diffusée (en rouge) est corrélé avec le premier pic du signal réfractométrique suivi directement par un épaulement corrélé au second pic. L'intensité de la lumière diffusée devient ensuite trop faible pour déterminer les masses molaires des oligosaccharides. La distribution des masses molaires dans les deux populations macromoléculaires est linéaire et varie de  $1 \times 10^3$  à  $100 \times 10^3$  g/mol sur l'ensemble des deux populations. Les masses molaires moyennes en poids ( $\overline{Mw}$ ) et les indices de polydispersité ( $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ ) sont présentés dans le Tableau 3.2,  $\overline{Mn}$  représentant les masses molaires moyennes en nombre.

**Tableau 3.2** – Masses molaires en poids ( $\overline{Mw}$ ), polydispersité ( $\overline{Mw}/\overline{Mn}$ ) et proportion (w/w) des deux populations macromoléculaires.

Lot	Population 1			Population 2		
	$\overline{Mw}$ (kDa)	$\overline{Mw}/\overline{Mn}$	Fraction*	$\overline{Mw}$ (kDa)	$\overline{Mw}/\overline{Mn}$	Fraction*
1	13,2 ± 0,1	1,3	55,6%	2,7 ± 0,1	1,2	44,4%
2	15,1 ± 0,1	1,4	57,3%	2,9 ± 0,1	1,1	42,7%
3	12,6 ± 0,1	1,2	49,0%	2,7 ± 0,1	1,2	51,0%
4	15,3 ± 0,1	1,3	55,9%	2,9 ± 0,1	1,2	44,1%
5	13,9 ± 0,1	1,3	51,3%	2,6 ± 0,1	1,2	48,7%
6	10,4 ± 0,1	1,2	48,3%	2,4 ± 0,1	1,1	51,7%
7	12,3 ± 0,1	1,3	52,2%	2,8 ± 0,1	1,1	47,8%
8	13,9 ± 0,1	1,3	60,1%	2,6 ± 0,1	1,1	39,9%
9	11,2 ± 0,1	1,3	53,6%	2,5 ± 0,2	1,1	46,4%
10	12,7 ± 0,1	1,3	60,0%	2,8 ± 0,2	1,1	40,0%
<b>Moyenne</b>	13,1 ± 1,6	1,3 ± 0,1	-	2,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	-

\*En poids

Une masse molaire moyenne en poids de 13100 g/mol est obtenue pour la population 1 et 2700 g/mol pour la population 2. L'indice de polydispersité est proche de 1 pour les deux populations, indiquant une faible dispersion des masses autour de la moyenne.

Les chromatogrammes HPSEC-MALLS-dRI des dix lots sont présentés en Annexe A.

### 3.1.2 Spectroscopie FT-IR

Les spectres FT-IR des dix lots ont tous le profil de polysaccharides sulfatés [29, 57, 277] : une bande large à  $3450\text{ cm}^{-1}$  (étirement des groupements O-H), deux bandes fines à  $2940\text{ cm}^{-1}$  et  $2885\text{ cm}^{-1}$  (étirement des liaisons C-H sur le cycle pyranose et les groupements méthyls des fucozes), deux bandes intenses à  $1620\text{ cm}^{-1}$  et  $1420\text{ cm}^{-1}$  (groupements COOH), une bande autour de  $1260\text{ cm}^{-1}$  (étirement de la liaison S=O) et deux faibles bandes à  $840\text{ cm}^{-1}$  et  $820\text{ cm}^{-1}$  (flexion axiale et équatoriale des liaisons C-O-S, respectivement).

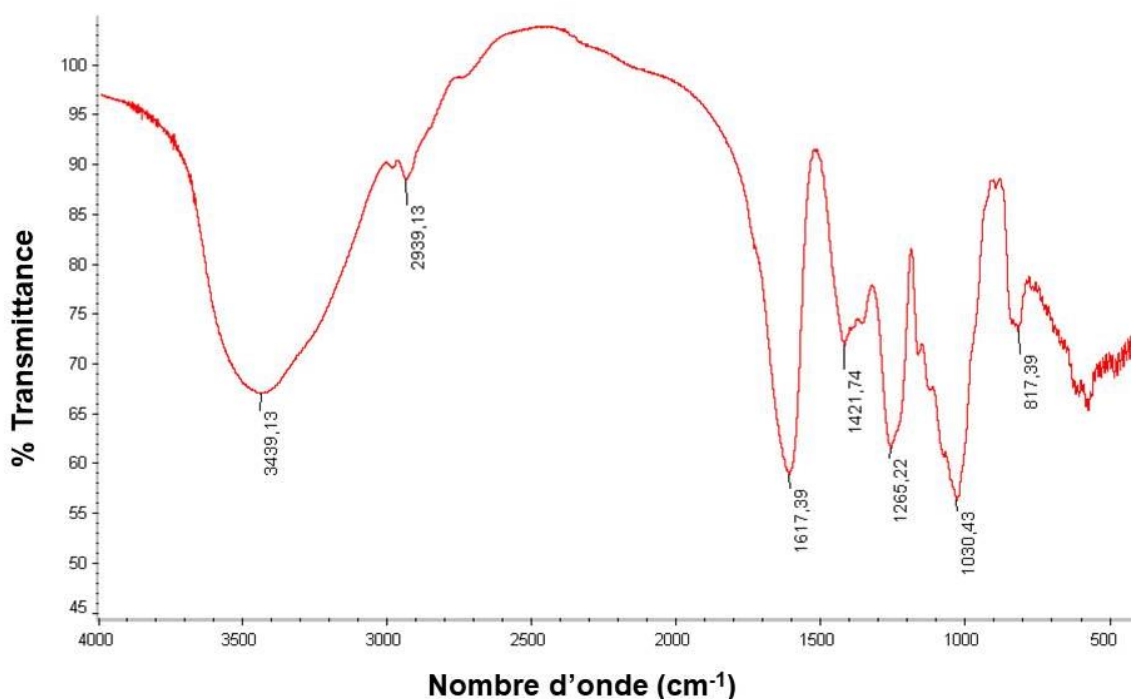


Figure 3.3 – Spectre FT-IR du lot 1.

Les spectres FT-IR des dix lots sont présentés en Annexe B.

### 3.1.3 Composition en monosaccharides et en sulfates

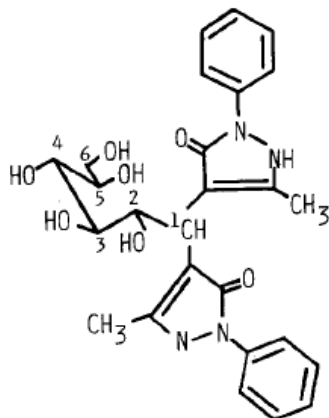
La composition en monosaccharides et la teneur en sulfates sont des caractéristiques essentielles fournies trop rarement dans les articles scientifiques traitant des fucoïdanes. Notamment le taux de sulfate qui est maintenant admis comme étant un facteur clé de leurs activités biologiques [100, 101, 133, 145].

Depuis ces dernières années, le LVTS réalisait des dosages colorimétriques pour titrer le fucose (dosage à la L-cystéine), les acides uroniques (dosage au carbazole) et les sulfates dans les fucoïdanes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.3. Cependant, malgré le dosage systématique de produits standards, les dosages des fucoses et des acides uroniques présentaient un manque de reproductibilité et étaient très sensibles aux variations de la température au sein du laboratoire (différence dans les résultats entre l'été et l'hiver par exemple). Par ailleurs, seuls les fucoses et les acides uroniques étaient dosés en utilisant ces méthodes, aucune donnée concernant les autres monosaccharides potentiellement présents n'était récoltée.

**Tableau 3.3** – Composition en fucose, acides uroniques et sulfates en g/100g des lots de LMWF par dosages colorimétriques.

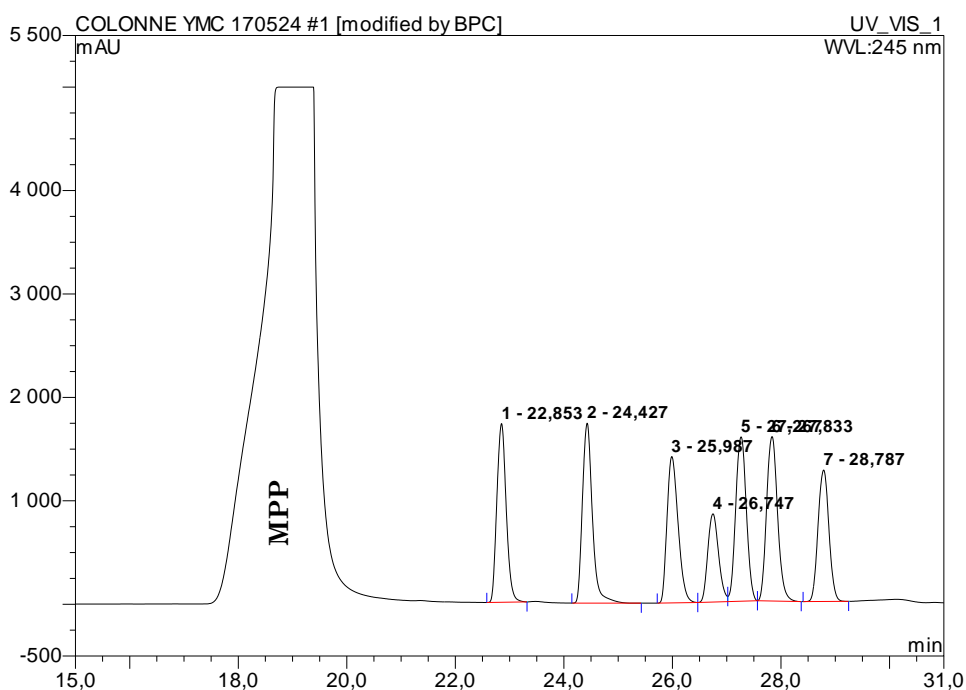
Lot	% Fucose	% Ac. Uron.	% Sulfates
1	27,9 ± 0,2	17,1 ± 0,1	16,4 ± 0,5
2	24,7 ± 0,2	17,5 ± 0,1	16,7 ± 0,7
3	25,0 ± 2,0	15,0 ± 1,0	14,2 ± 0,4
4	24,2 ± 0,1	17,5 ± 0,1	12,9 ± 0,7
5	17,2 ± 0,1	18,2 ± 0,1	15,8 ± 1,1
6	29,7 ± 0,2	15,9 ± 0,1	13,7 ± 0,2
7	25,6 ± 0,2	16,3 ± 0,1	17,1 ± 0,4
8	24,2 ± 0,3	17,1 ± 0,1	13,5 ± 0,7
9	21,4 ± 1,6	17,7 ± 1,1	14,3 ± 1,2
10	24,1 ± 2,8	17,2 ± 1,0	12,8 ± 0,4

Nous avons donc adapté une méthode par dérivation pré-colonne HPLC décrite par Zhang *et al.* [271] qui permet le dosage des oses neutres et des acides uroniques. Après l'hydrolyse acide des polysaccharides dans du TFA 2M à 110°C, les sucres sont dérivés avec du 3-Méthyl-1-Phényl-2-Pyrazoline-5-one (MPP) (Figure 3.4) dont le maximum d'absorbance peut être relevé à 245 nm. La quantité de chaque monosaccharide est alors déterminée à l'aide d'une solution de référence (Figure 3.5) et d'une référence interne composée de ribose.

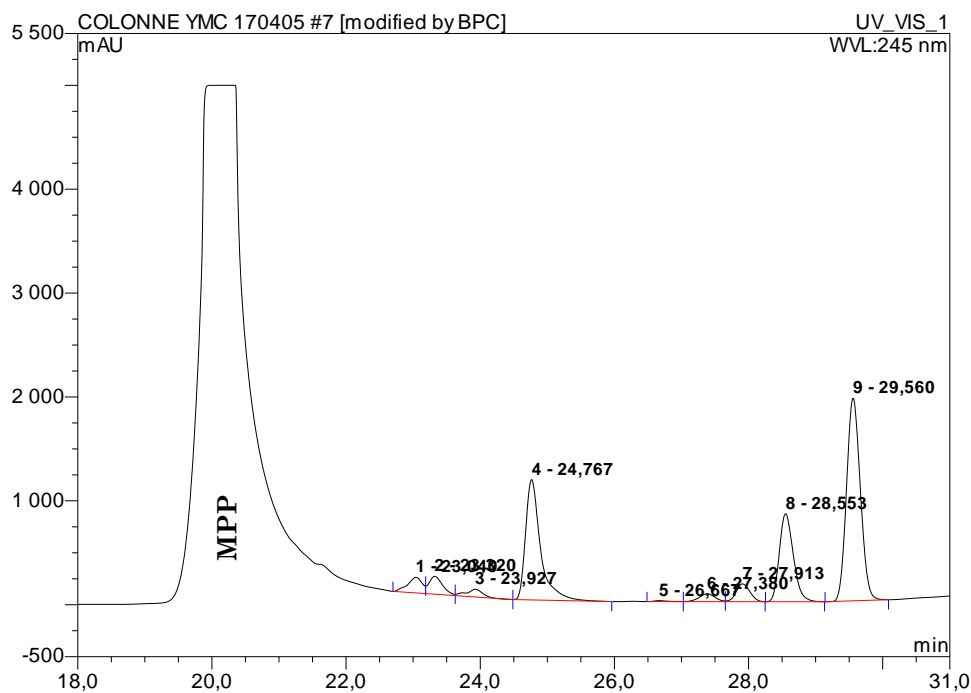


**Figure 3.4** – Glucose dérivé au MPP, adapté de [271].

Le premier constat fût la quasi absence d'acides uroniques dans la composition des fucoïdanes, contre 15 à 18 % (w/w) avec la méthode colorimétrique (Figure 3.6). Les fucoses sont bien présents en majorité suivi par les xyloses et un peu de galactose.

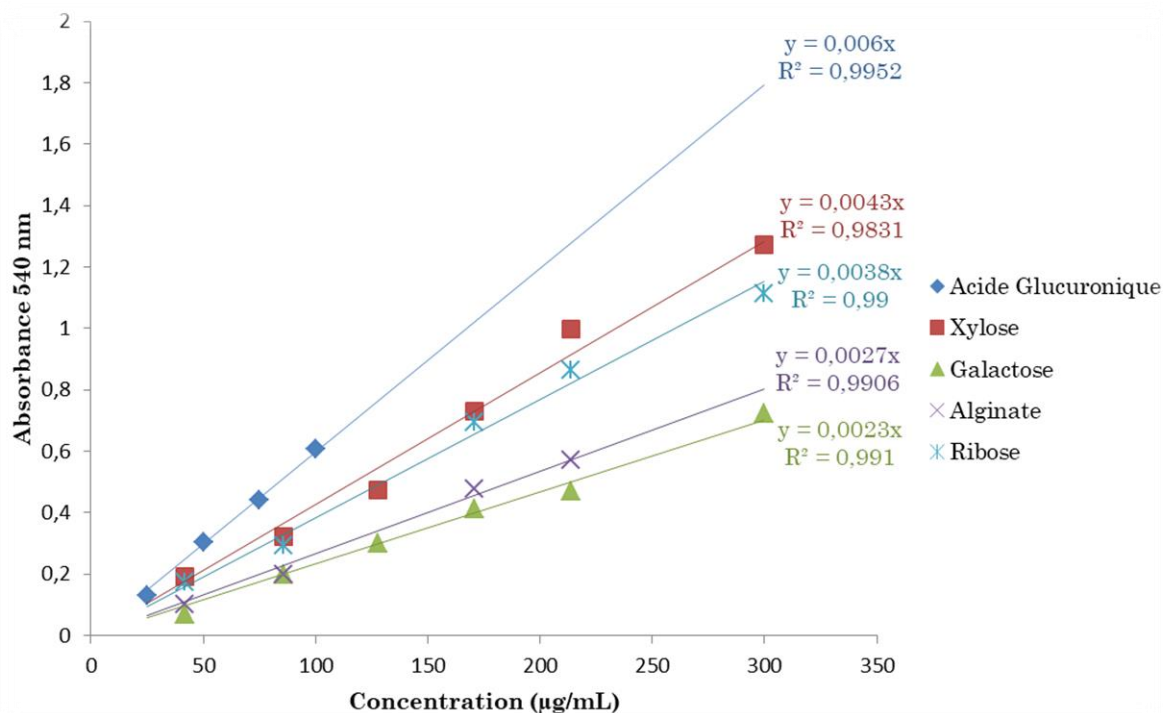


**Figure 3.5** – Chromatogramme de la solution de référence. (1) Mannose, (2) Ribose, (3) Ac. Glucuronique, (4) Glucose, (5) Galactose, (6) Xylose, (7) Fucose.



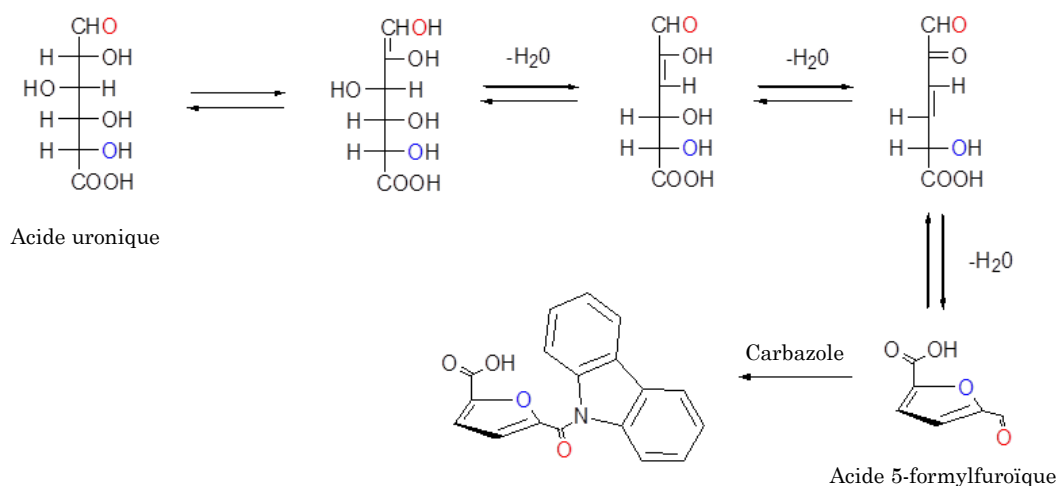
**Figure 3.6** – Chromatogramme d'un échantillon d'Ascophyscient®. (1) Mannose + Ac. Mannuronique, (2) Ac. Guluronique, (3) Impureté, (4) Ribose, (5) Ac. Glucuronique, (6) Glucose, (7) Galactose, (8) Xylose, (9) Fucose.

La pertinence du dosage colorimétrique des acides uroniques au carbazole a donc été remise en question. La réponse des autres monosaccharides à ce dosage, notamment du xylose qui est présent en grande quantité, a été évaluée (Figure 3.7).

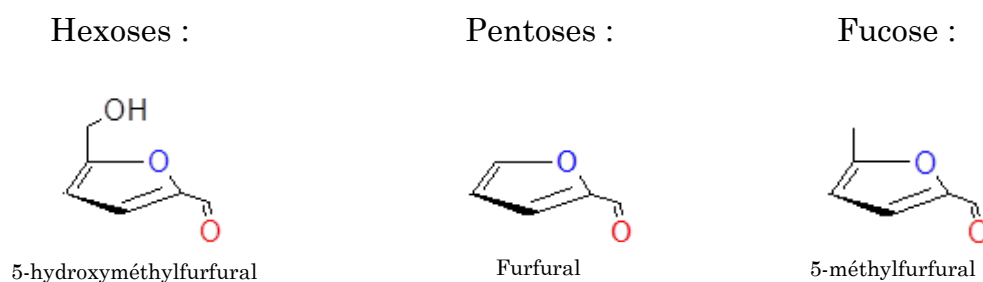


**Figure 3.7** – Réponse de différents sucres au dosage au carbazole.

Comme démontré sur la Figure 3.7, les autres monosaccharides répondent également au dosage. Il est intéressant de voir que les alginates, des polysaccharides composés exclusivement d'acide mannuronique et d'acide guluronique ne répondent pas de la même manière que l'acide glucuronique. Seul le fucose ne présentait aucune réponse. En reprenant les articles sur lesquels sont basés cette méthode, l'auteur met en garde sur l'utilisation de ce dosage pour les polysaccharides, décrivant de possibles interférences avec les autres sucres présents [269, 278]. Le mécanisme de la réaction permettant le dosage est décrit ci-après (Figure 3.8). Bowness a étudié en 1958 l'intensité des absorptions UV de différents intermédiaires réactionnels couplés au carbazole comme ceux présentés sur la Figure 3.9 [279]. On peut y lire que l'acide 5-formylfuroïque, composé issu de la déshydratation d'acides uroniques est bien le composé qui absorbe le plus à 525 nm, longueur d'onde à laquelle l'absorbance est relevée pour le dosage au carbazole. Le furfural et le 5-hydroxyméthyl furfural, issus respectivement des pentoses et des hexoses, ont également un maximum d'absorption à 525 nm ou à une longueur d'onde proche. Pour le cas du 5-méthylfurfural, issu du fucose, aucune explication n'est fournie dans l'article. Il se pourrait que l'encombrement stérique apporté par le groupement méthyl du fucose empêche la liaison du carbazole mais cela ne reste qu'une hypothèse.



**Figure 3.8** – Mécanisme réactionnel de la condensation du carbazole sur un acide uronique.

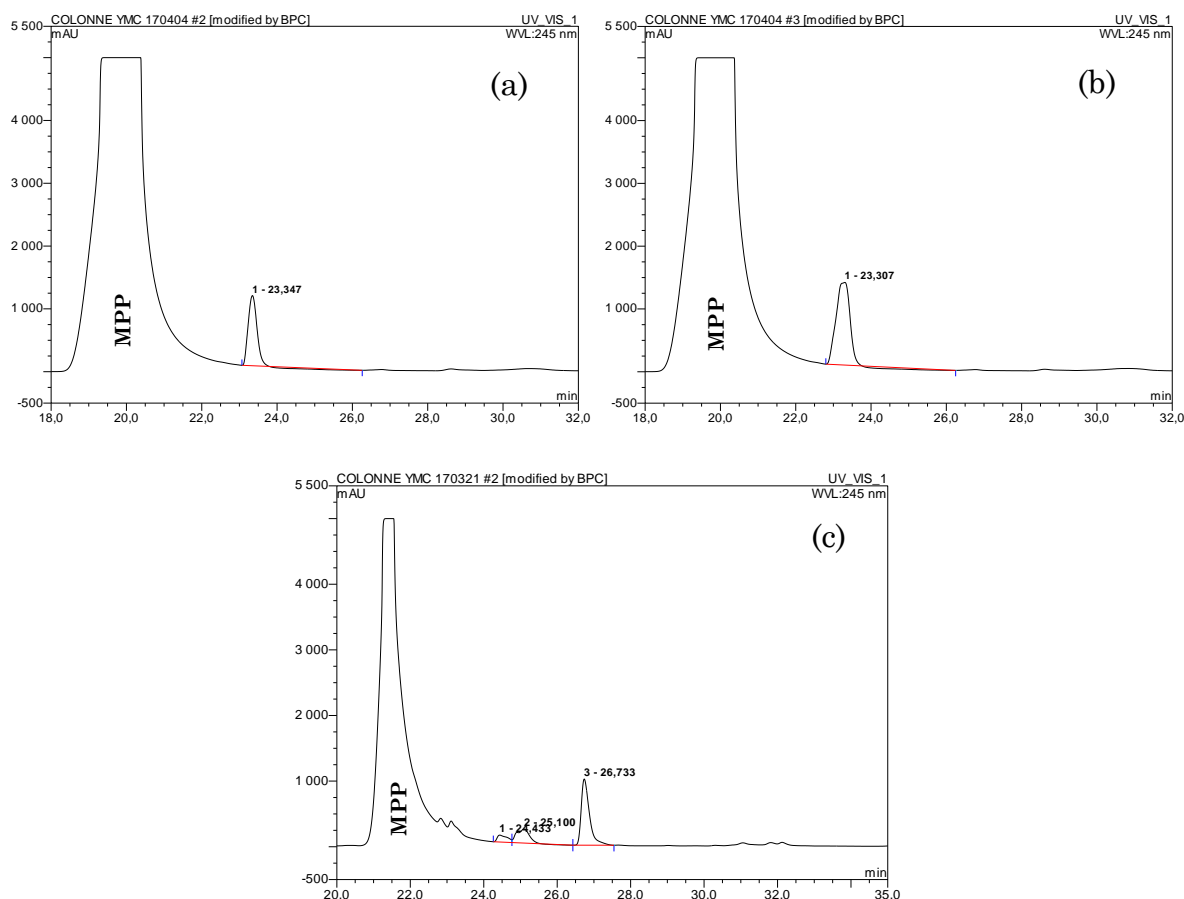


**Figure 3.9** – Intermédiaires réactionnels à partir de différents sucres.

Afin de confirmer les résultats obtenus mais également d'identifier les trois premiers pics du chromatogramme (Figure 3.6) qui ne correspondaient à aucun monosaccharide de référence, nous avons couplé la colonne à un spectromètre de masse afin d'identifier chaque pic. La spectrométrie de masse a permis de détecter la présence de deux acides uroniques (pic 1 et 2, Figure 3.6) et la présence d'un disaccharide composé d'un acide uronique et d'un hexose (pic 3, Figure 3.6). Les deux acides uroniques ont par la suite été identifiés comme étant de l'acide mannuronique et de l'acide guluronique, les deux composants de l'alginate, très probablement co-extrait avec les fucoïdanes. L'acide mannuronique possède le même de temps de rétention que le mannose, empêchant ainsi le dosage de ce dernier. Cette observation a été confirmée en injectant une solution composée uniquement de mannose et d'acide mannuronique, un seul pic est observé (Figure 3.10). Une solution d'alginate a également été injectée, on retrouve les pics de l'acide mannuronique et



guluronique précédent celui du ribose. Pour pallier à ce problème, le pourcentage de mannose dans le premier pic a été évalué à 44% sur 3 échantillons à l'aide de la spectrométrie de masse, permettant d'avoir une estimation de la quantité de mannose. Le disaccharide n'a pas pu être identifié malgré des tests effectués en augmentant le temps d'hydrolyse. On peut également apercevoir sur les chromatogrammes l'excès de MPP correspondant à la large bande autour de 20min.



**Figure 3.10** – Chromatogramme HPLC d'une solution d'Acide Mannuronique (a), de Mannose + Acide Mannuronique (b) et d'alginate (c).

Les dix lots d'Ascophyscient® ont été analysés par cette méthode. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.5 en pourcentage (g/100g) et en ratios molaires comparés au fucose dans le Tableau 3.6. On retrouve une majorité de fucoses sulfatés et de xyloses. Les ratios molaires indiquent la présence de sulfates sur environ 80% des fucoses. La reproductibilité de la composition en monosaccharides des lots d'Ascophyscient® démontre que la période de récolte n'a aucun effet sur les caractéristiques chimiques finales des fucoïdanes.

Les chromatogrammes des dix lots sont présentés en Annexe C.

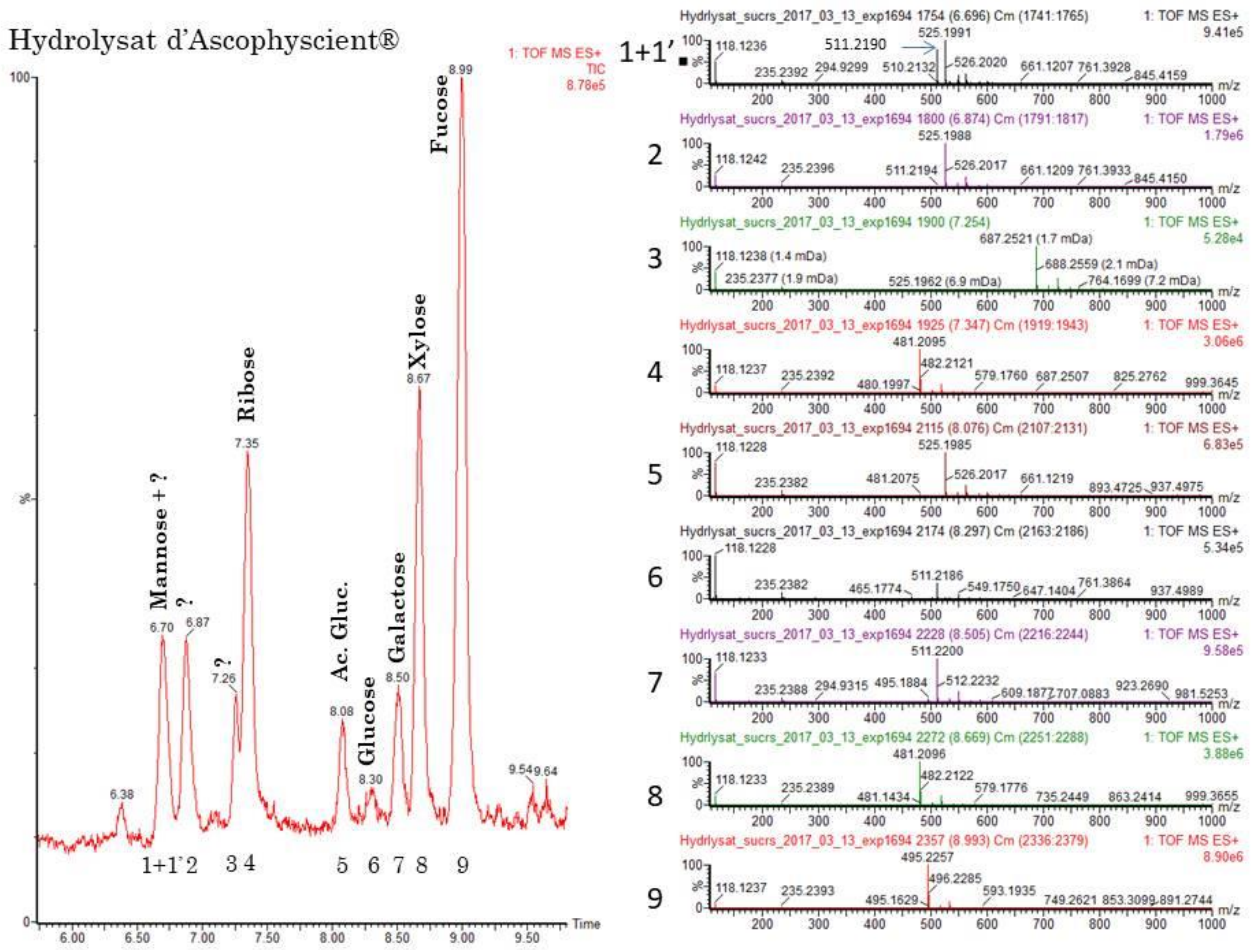


Figure 3.11 – Analyse par spectrométrie de masse d'un hydrolysate d'Ascophyscient®.

**Tableau 3.4** – Attribution des pics de spectrométrie de masse.

	Pic	m/z Théorique	m/z Solution de Référence	m/z Hydrolysats Ascophyscient®
Mannose	1	511,2193	511,2182	511,2190
Ac. Mann.	1'	525,1985	-	525,1984
Ac. Gulu.	2	525,1985	-	525,1987
Disacchar.	3	687,2459	-	687,2512
Ribose	4	481,2087	481,2089	481,2095
Ac. Gluc.	5	525,1985	525,1984	525,1979
Glucose	6	511,2193	511,2198	511,2190
Galactose	7	511,2193	511,2194	511,2192
Xylose	8	481,2087	481,2085	481,2093
Fucose	9	495,2243	495,2239	495,2248

**Tableau 3.5** – Composition en monosaccharides en g/100g des lots d'Ascophyscient® déterminée par dosage HPLC.

Lot	%Fucose	%Sulfate*	%Xylose	%Galactose	%Mannose	%Ac. Gluc.	%Glucose	%Total
1	28,7 ± 1,9	16,4 ± 0,5	8,9 ± 0,4	2,0 ± 0,1	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	59,1
2	28,2 ± 0,4	16,7 ± 0,5	9,6 ± 0,1	2,4 ± 0,3	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	60,2
3	29,3 ± 0,1	14,2 ± 0,4	11,4 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	60,0
4	29,9 ± 1,1	12,9 ± 0,7	12,9 ± 0,3	2,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1	60,9
5	28,5 ± 1,3	15,8 ± 1,1	10,5 ± 0,4	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	60,6
6	29,9 ± 0,7	13,7 ± 0,2	8,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	56,7
7	29,2 ± 1,6	17,1 ± 0,4	8,1 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	62,9
8	29,4 ± 0,6	13,5 ± 0,7	8,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,8 ± 0,3	0,7 ± 0,2	59,4
9	29,9 ± 0,2	14,3 ± 1,2	9,9 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,3 ± 0,4	2,4 ± 0,1	64,1
10	29,4 ± 0,1	12,8 ± 0,4	8,7 ± 0,4	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	55,7
Moyenne	29,2 ± 0,6	14,7 ± 1,6	9,8 ± 1,5	2,0 ± 0,3	2,0 ± 1,0	1,2 ± 0,7	0,9 ± 0,6	60,0 ± 2,5

\*Déterminé par dosage colorimétrique

**Tableau 3.6** – Composition en monosaccharides en ratios molaires par rapport au fucose des lots d'Ascophyscient® déterminée par dosage HPLC.

Lot	%Fucose	%Sulfate*	%Xylose	%Galactose	%Mannose	%Ac. Gluc.	%Glucose
1	1,00	0,87	0,34	0,06	0,03	0,03	0,06
2	1,00	0,90	0,38	0,08	0,05	0,02	0,04
3	1,00	0,73	0,43	0,06	0,06	0,02	0,03
4	1,00	0,65	0,48	0,07	0,05	0,02	0,07
5	1,00	0,84	0,40	0,07	0,07	0,02	0,03
6	1,00	0,70	0,33	0,05	0,04	0,04	0,01
7	1,00	0,89	0,31	0,07	0,04	0,07	0,07
8	1,00	0,70	0,33	0,05	0,04	0,05	0,02
9	1,00	0,73	0,37	0,07	0,04	0,06	0,07
10	1,00	0,66	0,33	0,05	0,03	0,02	0,05
Moyenne	1,00	0,77	0,37	0,06	0,04	0,04	0,04

\*Déterminé par dosage colorimétrique

### 3.1.4 Analyses élémentaires

Les taux de carbone (C), d'azote (N), d'hydrogène (H) et de soufre (S) ont été déterminés par analyses élémentaires. Le taux d'oxygène n'a pas été mesuré à cause de la présence de sodium qui interférerait sur les résultats obtenus. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.7.

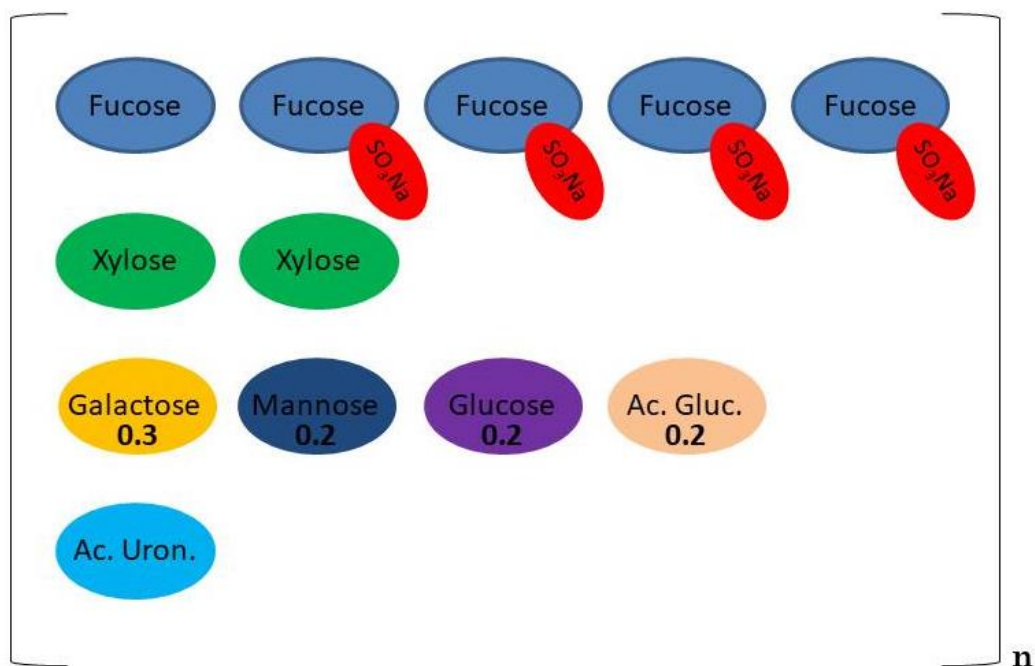
**Tableau 3.7** – Analyses élémentaires en g/100g.

Lot	%C	%H	%N	%S	%S/%C
1	27,9 ± 0,1	4,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	5,7 ± 0,1	0,204
2	27,9 ± 0,3	4,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	0,201
3	27,5 ± 0,1	4,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,4 ± 0,1	0,196
4	28,5 ± 0,4	4,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1	5,5 ± 0,1	0,193
5	28,3 ± 0,1	4,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,4 ± 0,1	0,191
6	28,4 ± 0,1	4,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	5,8 ± 0,1	0,204
7	28,6 ± 0,2	4,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	5,8 ± 0,1	0,203
8	28,2 ± 0,4	4,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,7 ± 0,1	0,202
9	28,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	0,188
10	28,6 ± 0,3	4,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	5,8 ± 0,1	0,203
Moyenne	28,2 ± 0,4	4,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	5,6 ± 0,2	0,199 ± 0,006

La reproductibilité des lots est une nouvelle fois flagrante. Aucun monosaccharide aminé n'a jamais été retrouvé dans des fucoïdanes extraits

d'*Ascophyllum nodosum*, le faible taux d'azote peut être attribué à des protéines résiduelles co-extraites avec les fucoïdanes.

La dépolymérisation des extraits bruts par le peroxyde d'hydrogène a conduit à des familles macromoléculaires reproductibles comme démontré dans le Tableau 3.2. Le Tableau 3.6 suggère que les groupements sulfates sont retrouvés sur quatre fucozes sur cinq ; deux unités xylozes toutes les cinq unités fucoze ; une unité mannose, glucose ou acide glucuronique est retrouvée toutes les vingt-cinq unités de fucoze et un galactose toutes les dix-sept unités fucoze. Pour satisfaire cette composition et le ratio  $\%S/\%C = 0,199$  déterminé à l'aide des analyses élémentaires, une unité d'acide uronique doit être ajoutée à la composition décrite plus haut pour obtenir un ratio théorique  $\%S/\%C = 0,205$ . Cela confirme la présence d'alginate (composés d'acides mannuroniques et guluroniques) dans Ascophyscient® démontrée précédemment dans ce chapitre. Les ratios  $\%S/\%C$  étant identiques pour tous les lots, la même quantité d'alginate est retrouvée et correspondrait à 12,5% en poids du produit. Une composition théorique d'Ascophyscient® est présentée sur la Figure 3.12.



**Figure 3.12-** Composition théorique d'Ascophyscient®. Les chiffres présents sous les unités de galactose, mannose, glucose et acide glucuronique représentent la quantité de chacune de ces unités pour les cinq unités fucoze.

### 3.1.5 Cendres totales

La quantité de cendres a été analysée sur les dix lots de LMWF en calcinant les produits jusqu'à 600°C dans un minéralisateur. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.8.

**Tableau 3.8** – Pourcentage de cendres en poids des lots d'Ascophyscient®.

Lot	%Cendres	%Total*
1	35,9	107,6
2	35,6	108,3
3	35,9	108,4
4	34,2	107,5
5	36,1	109,2
6	33,6	102,9
7	32,8	108,2
8	33,2	105,0
9	34,1	110,7
10	35,3	103,4
Moyenne	34,7 ± 1,2	-

\*Somme des cendres, des sucres et des 12,5% d'alginate théoriques

Afin de déterminer la composition de ces cendres, une analyse ICP-MS a été réalisée sur un lot (lot n°3). Vingt-six métaux ont été détectés comme présenté dans le Tableau 3.9 pour un total de 11,56% du produit en poids.

**Tableau 3.9** – Analyse ICP-MS d'un lot d'Ascophyscient®.

Éléments	mg/kg
Magnésium	9680
Calcium	16212
Potassium	13569
Sodium	75926
Phosphore	160
Argent	<0,17
Aluminium	17,03
Arsenic	6,83
Baryum	9,92
Bore	14,1
Cadmium	<0,08
Cobalt	0,08
Chrome	1,51
Cuivre	1,17
Fer	30,37
Mercure	<0,08
Lithium	1,9
Manganèse	16,18
Molybdène	0,09
Nickel	<0,83
Plomb	<0,08
Antimoine	<0,83
Sélénium	<0,33
Étain	2,75
Vanadium	0,76
Zinc	3,84
<b>Total</b>	<b>115655,93</b>

Les résultats d'ICP-MS ont remis en question la teneur en cendres d'Ascophyscient®, notamment la possible interférence des sulfates qui fausserait alors le calcul (il s'agirait de cendres sulfuriques). Une autre analyse par thermogravimétrie (ATG) a donc été réalisée sur le même lot. Cette technique permet d'atteindre des températures élevées jusqu'à 1500°C, éliminant ainsi les sulfates possiblement présents sous forme de MgSO<sub>4</sub> ou MnSO<sub>4</sub> qui sont stables jusqu'à 800-1000°C [280]. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.13, 92% du produit a été calciné soit 8% de cendres. Cette différence est expliquée par la présence d'un palier vers 1350°C entraînant la perte de 15% de produit supplémentaire. Ces résultats, bien plus cohérents avec les quantités de métaux obtenues par ICP-MS (11%), valide l'hypothèse de la présence de cendres sulfuriques dans les 35% de cendres obtenues précédemment qui seraient alors calcinées vers 1350°C. La présence de sulfates dans les cendres obtenues par calcination à 600°C a été attestée par dosage colorimétrique. Cependant, l'insolubilité dans l'eau des cendres limite la réaction des sulfates réduits en

sulfure d'hydrogène avec l'acétate de zinc pour permettre leur dosage. Des essais ont été réalisés en diluant les cendres jusqu'aux limites régies par la taille de la verrerie utilisable avec le protocole de dosage ainsi qu'en augmentant le temps de réaction, sans résultat (présence de sulfure d'hydrogène en excès). Néanmoins, ces données témoignent de la forte proportion de sulfates dans les cendres. Une analyse élémentaire est en cours pour en déterminer la proportion exacte.

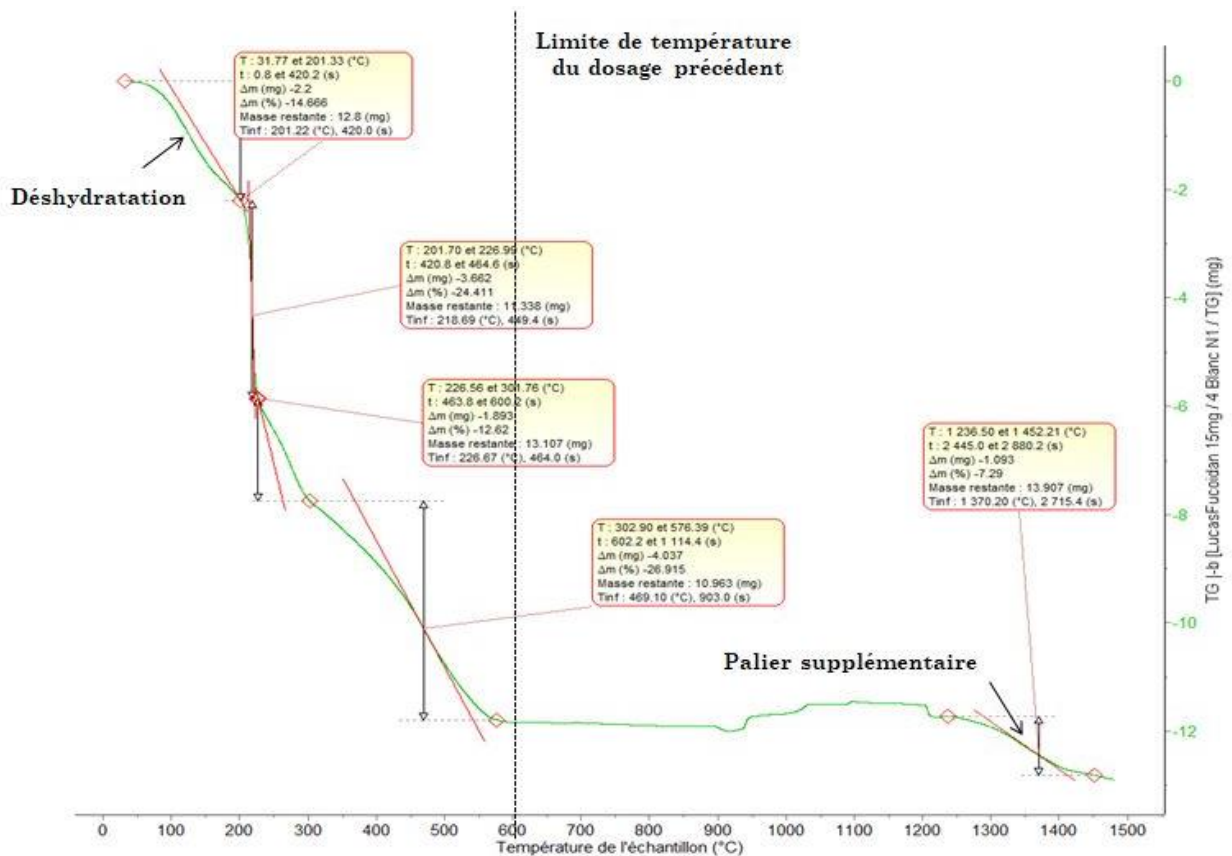


Figure 3.13 – Résultats d'ATG sur le lot n°3 d'Ascophyscient®.



### 3.1.6 Composition moyenne d'Ascophyscient®

À partir des résultats obtenus par les analyses physico-chimiques, une composition moyenne des lots de LMWF peut être donnée. Ces résultats sont regroupés dans le Tableau 3.10. La reproductibilité des dix lots analysés permet d'obtenir des spécifications étroites. De ce fait, malgré la présence non négligeable mais reproductible d'alginate, Ascophyscient® est un LMWF idoine pour débiter des recherches dans le milieu biomédical.

**Tableau 3.10** – Caractéristiques physico-chimiques moyennes d'Ascophyscient®.

	Mw (Pop1)	Mw (Pop2)	%Fucose*	%Sulfate*	%Oses*†	%Cendres*
Ascophyscient®	13,1 ± 1,6 kDa	2,7 ± 0,2 kDa	29,2 ± 0,6	14,7 ± 1,6	60,0 ± 2,5	34,7 ± 1,2

\*En g/100g

†Comprenant le fucose

À partir de ce produit, le LVTS a développé des techniques de purification afin d'obtenir des fractions de grade pharmaceutique, pour le développement clinique de phase 1 d'un radiopharmaceutique micro-dosé en tant qu'agent d'imagerie moléculaire en scintigraphie, pour le diagnostic des pathologies athérotrombotiques.

## **3.2. Mise au point d'une fraction de fucoïdane de bas poids moléculaire (LMWF) de grade pharmaceutique.**

### *3.2.1 Méthode de purification*

Pour le développement clinique d'agents thérapeutiques ou diagnostiques, tous les composants administrés à l'Homme doivent être de grade pharmaceutique, c'est-à-dire avoir été produits en suivant les bonnes pratiques de fabrication (BPF) comme décrites dans la pharmacopée Européenne. Le LVTS a développé deux méthodes de purifications afin d'affiner les caractéristiques physico-chimiques des fucoïdanes, d'augmenter le taux de fucooses sulfatés, admis comme étant responsables des activités biologiques des fucoïdanes, d'éliminer les éventuelles impuretés comme les alginates ou des oligosaccharides ainsi que diminuer la quantité de minéraux. La première méthode consistait en un traitement d'une solution de fucoïdanes par de l'acétate de calcium. La solution était maintenue à 55°C pendant 4h avec un contrôle continu du pH qui devait rester entre 6,5 et 7,5 puis la solution était laissée une nuit à 4°C [198]. Un précipité se formait et était retiré par centrifugation. Le surnageant était alors dialysé contre de l'eau ou ultrafiltré avant d'être lyophilisé. Par la suite, un traitement plus simple fût développé. Une solution de fucoïdane était portée à pH10 à l'aide de NaOH. La solution était alors laissée au repos une nuit à 4°C. Le précipité qui s'était formé était retiré par centrifugation et le surnageant était dialysé contre de l'eau ou ultrafiltré avant d'être lyophilisé. Cette méthode a permis d'augmenter le pourcentage de fucooses sulfatés dans le produit par rapport au produit brut comme démontré dans le Tableau 3.11. L'analyse élémentaire a également montré une augmentation du taux de soufre dans le produit purifié.

**Tableau 3.11** – Comparaison des paramètres physico-chimiques d'un lot d'Ascophyscient® (lot 7) et de son homologue purifié (dénommé ASPHY-pH).

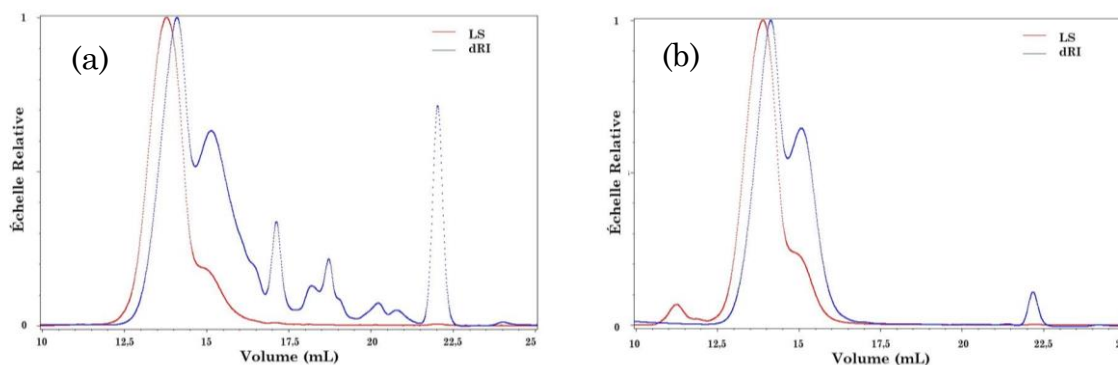
	Mw (Pop1)	Mw (Pop2)	%Fuc.*	%Sulf.*	%Oses*†	%Cendres*	%S/%C**
Ascophyscient®	12,3 kDa	2,8 kDa	29,2	17,1	62,9	34,7	0,203
ASPHY-pH	9,7 kDa	2,7 kDa	30,1	26,5	72,3	21,8	0,256

\*En g/100g

\*\*Déterminé par analyses élémentaires

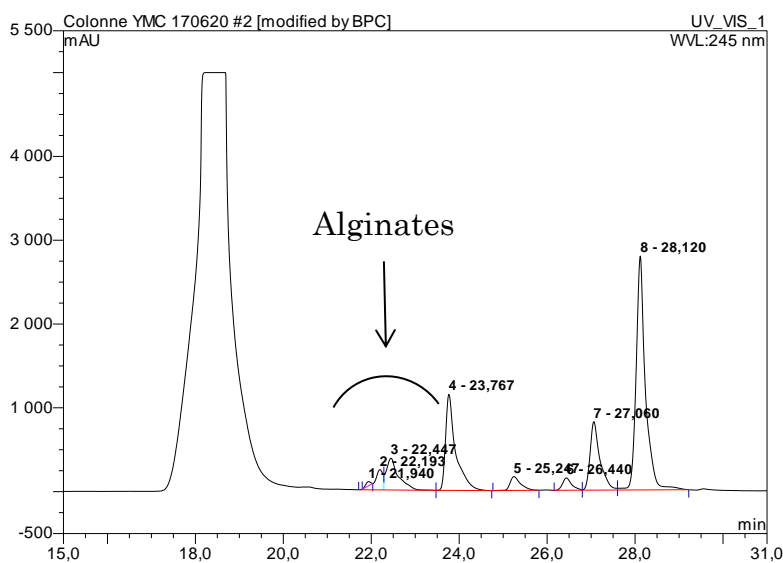
†Comprenant le fucoose

Le chromatogramme d'HPSEC-MALLS-dRI d'ASPHY-pH montre la disparition des oligosaccharides ( $V > 16,5$  mL) (Figure 3.14), seules les deux familles macromoléculaires subsistent dans le produit.



**Figure 3.14** – Comparaison des chromatogrammes d'HPSEC-MALLS-dRI de : (a) Ascophyscient® et (b) ASPHY-pH.

Par ailleurs, le précipité récolté après centrifugation a été analysé après avoir été dialysé contre de l'eau et lyophilisé. Deux produits se distinguent dans le précipité : le premier, une mousse blanche, présente le même spectre FT-IR qu'Ascophyscient® (Figure 3.16) alors que le second, une poudre marron, possède les bandes caractéristiques des alginate à  $\approx 1615$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $\approx 1410$   $\text{cm}^{-1}$  (vibration COOH) et  $1026$   $\text{cm}^{-1}$  (vibration C-O du cycle pyranose) [281] (Figure 3.17). Des fucoïdanes ont donc été co-précipités avec des alginate par ce traitement. Cependant, des alginate sont toujours présents dans ASPHY-pH, mis en évidence sur le chromatogramme HPLC (Figure 3.15).



**Figure 3.15** – Chromatogramme HPLC d'ASPHY-pH.

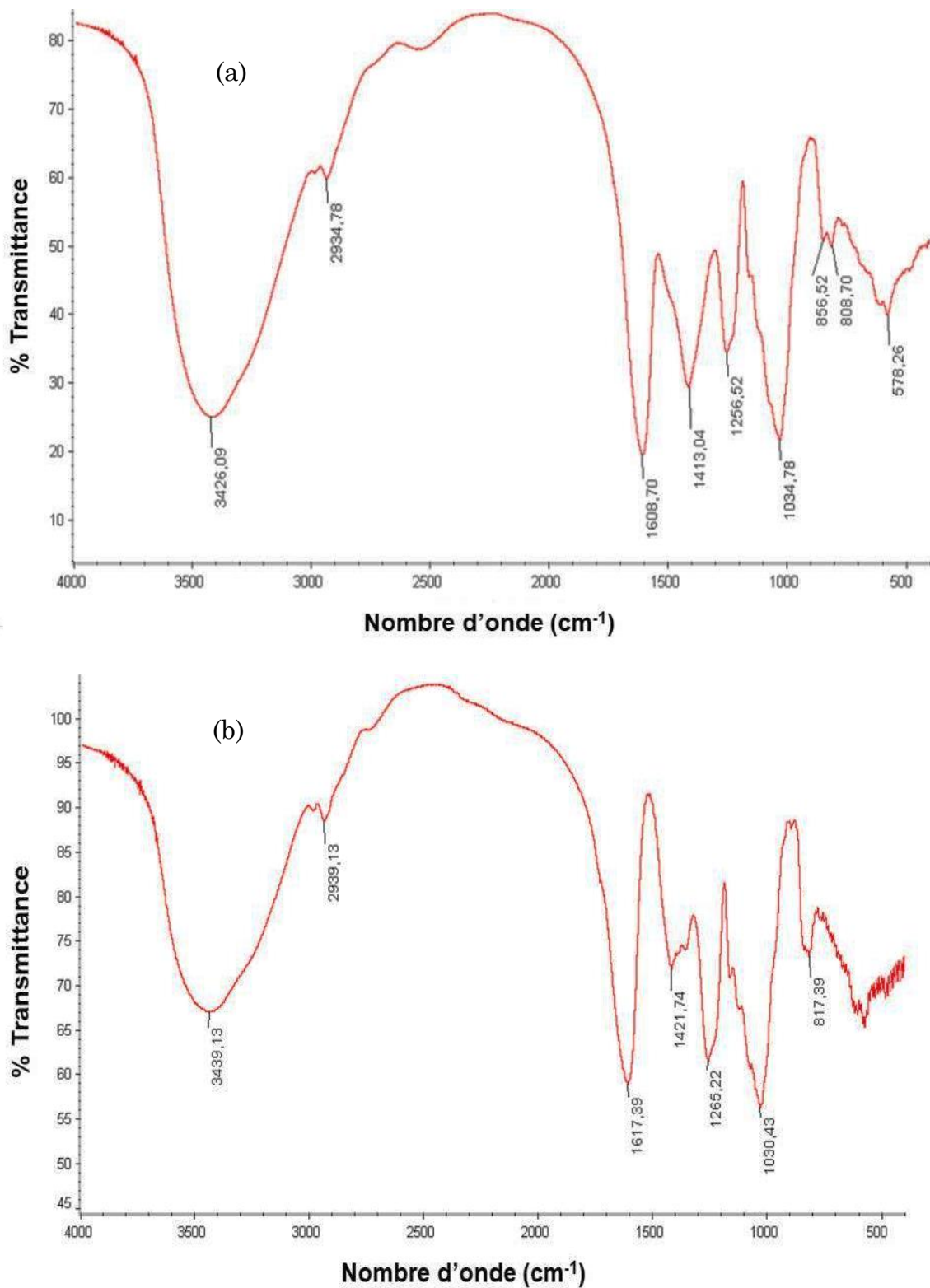


Figure 3.16 – Spectres FT-IR du précipité blanc (a) et d'Ascophyscient® (b).

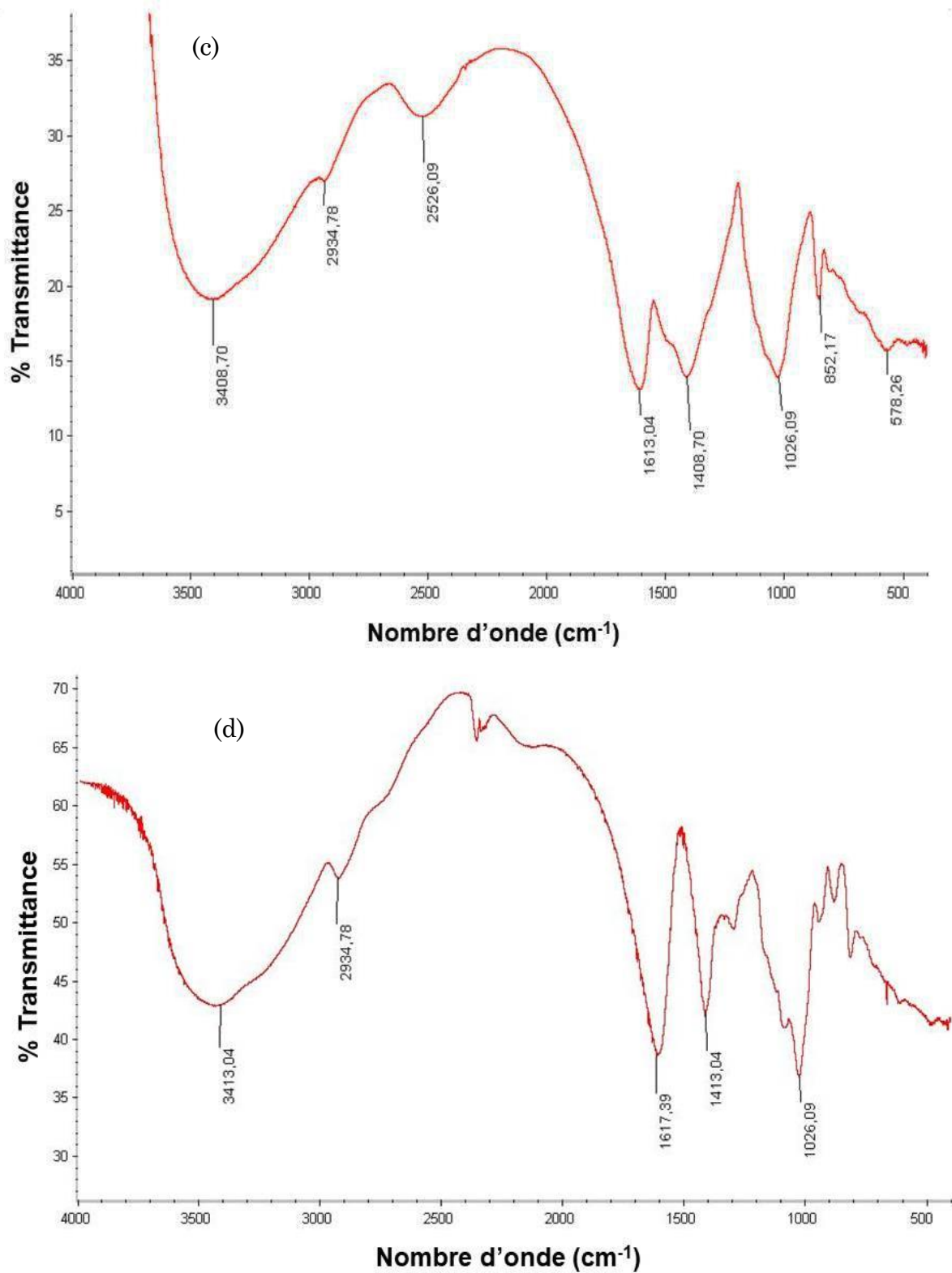
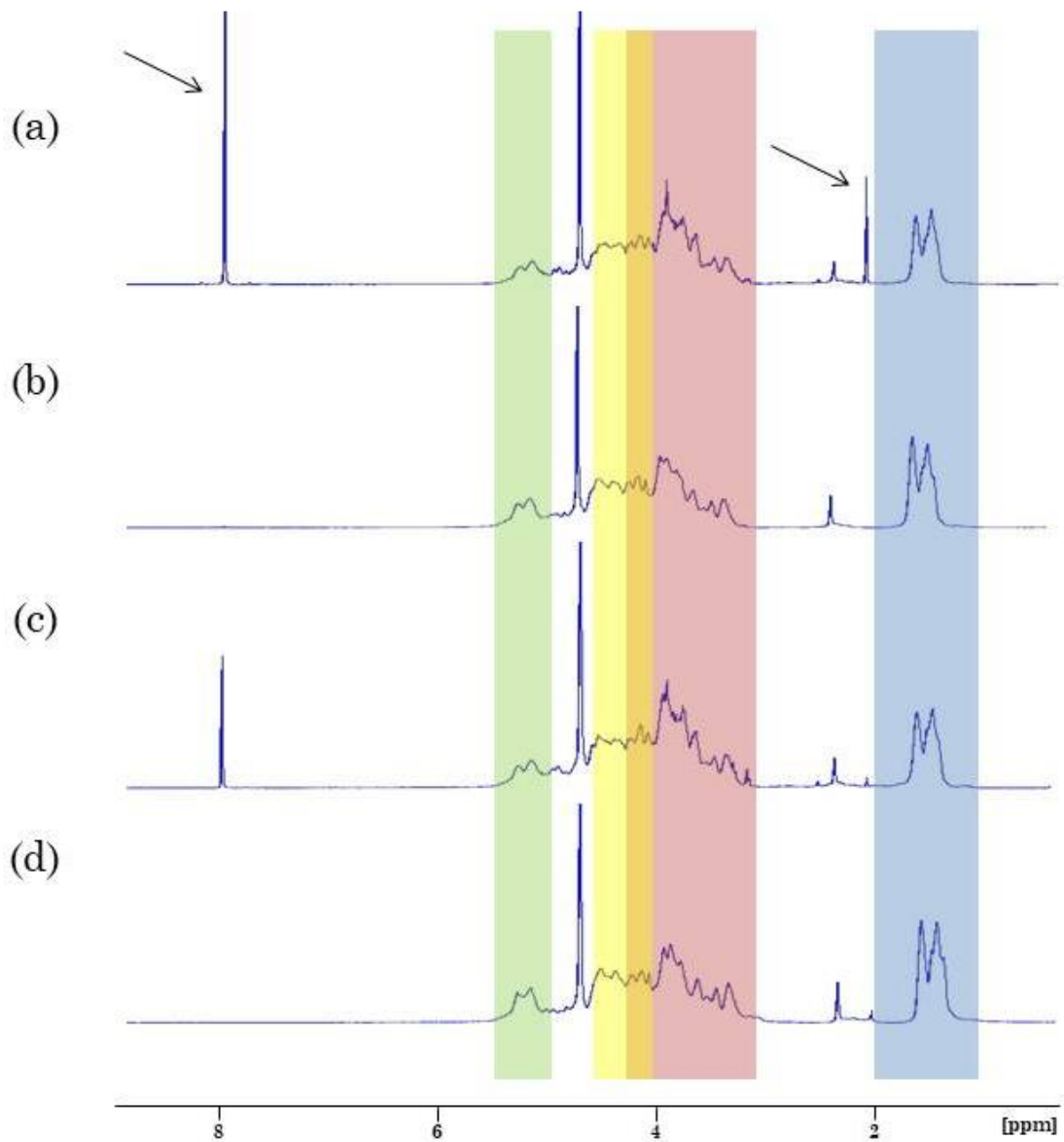


Figure 3.17 – Spectres FT-IR du précipité marron (c) et d'Alginates (d).

### 3.2.2 Optimisation du procédé de purification

Dans le processus de production d'Ascophyscient®, les fucoïdanes subissent une atomisation pour être séchés et obtenus sous forme de poudre. Suite à l'observation en spectroscopie RMN <sup>1</sup>H de pics autour de 8ppm et 2ppm sur les spectres RMN d'Ascophyscient® et leur disparition après un traitement à pH10 qui comporte une étape de dialyse, nous nous sommes demandé si la dialyse seule (et non le traitement basique) n'était pas responsable de la disparition de ces pics et si leur provenance n'était pas dû à l'atomisation. Cette question s'est posée après avoir traité 20g d'Ascophyscient® à pH10 et récolté seulement 200mg de précipité, soit 1% (w/w) du produit de départ. Une analyse RMN <sup>1</sup>H a alors été conduite sur quatre produits : Ascophyscient®, ASPHY-pH, Ascophyscient® dialysé (non traité pH10) et Ascophyscient® lyophilisé avant atomisation. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.18. Sur le spectre d'Ascophyscient® (a) on peut voir deux pics intenses à 8 et 2 ppm qui disparaissent après un traitement basique (b). Ces pics, notamment le pic à 2 ppm, diminuent drastiquement après une simple dialyse sur Ascophyscient® (c). De plus, le spectre d'Ascophyscient® non atomisé mais lyophilisé ne présente aucun pic à 8 ou 2 ppm. L'atomisation du produit entraîne donc la création d'impuretés. Afin de purifier le produit de ces impuretés, une optimisation de la dialyse ou une ultrafiltration pourrait être suffisantes.

Afin de confirmer ces résultats et d'étudier l'impact du traitement pH10 sur la composition des fucoïdanes issus d'Ascophyscient® lyophilisé, les masses molaires et leurs distributions, la composition en monosaccharides ainsi que le taux de sulfates ont été mesurés sur un produit ayant été lyophilisé avant atomisation et qui a subi ou non un traitement basique ou juste une dialyse contre de l'eau. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec de l'Ascophyscient® ayant subi les mêmes traitements. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.12.



**Figure 3.18** – Spectres RMN  $^1\text{H}$  (99,8%  $\text{D}_2\text{O}$ , 500MHz) d'Ascophyscient® (a), d'ASPHY-pH (b), Ascophyscient® dialysé (c) et Ascophyscient® lyophilisé avant atomisation (d). En vert, les protons anomériques d' $\alpha$ -L-fucoses ; en jaune, les protons H-2, H-3 et H-4 de fucoses sulfatés ; en rouge, les protons H-2, H-3, H-4 et H-5 d'oses et d'acides uroniques non sulfatés ; en bleu, les protons de groupements méthyls. Adapté de [200].

**Tableau 3.12** – Analyses physico-chimiques sur six LMWF ayant subis ou non un traitement pH10 ou une dialyse.

Produit	Séchage	pH/Dial	MwP1	MwP2	%Fucose*	%Sulfate*	%Oses**†
1**	Atom.	-	12,3 kDa	2,8 kDa	29,2	17,1	62,9
2	Atom.	pH10	9,7 kDa	2,7 kDa	30,1	26,5	72,3
3	Atom.	Dialyse	12,9 kDa	3,1 kDa	29,9	19,4	64,9
4	Lyoph.	-	14,5 kDa	3,6 kDa	28,6	16,4	62,2
5	Lyoph.	pH10	11,9 kDa	3,6 kDa	30,4	24,9	71,9
6	Lyoph.	Dialyse	11,7 kDa	3,3 kDa	29,8	24,9	71,6

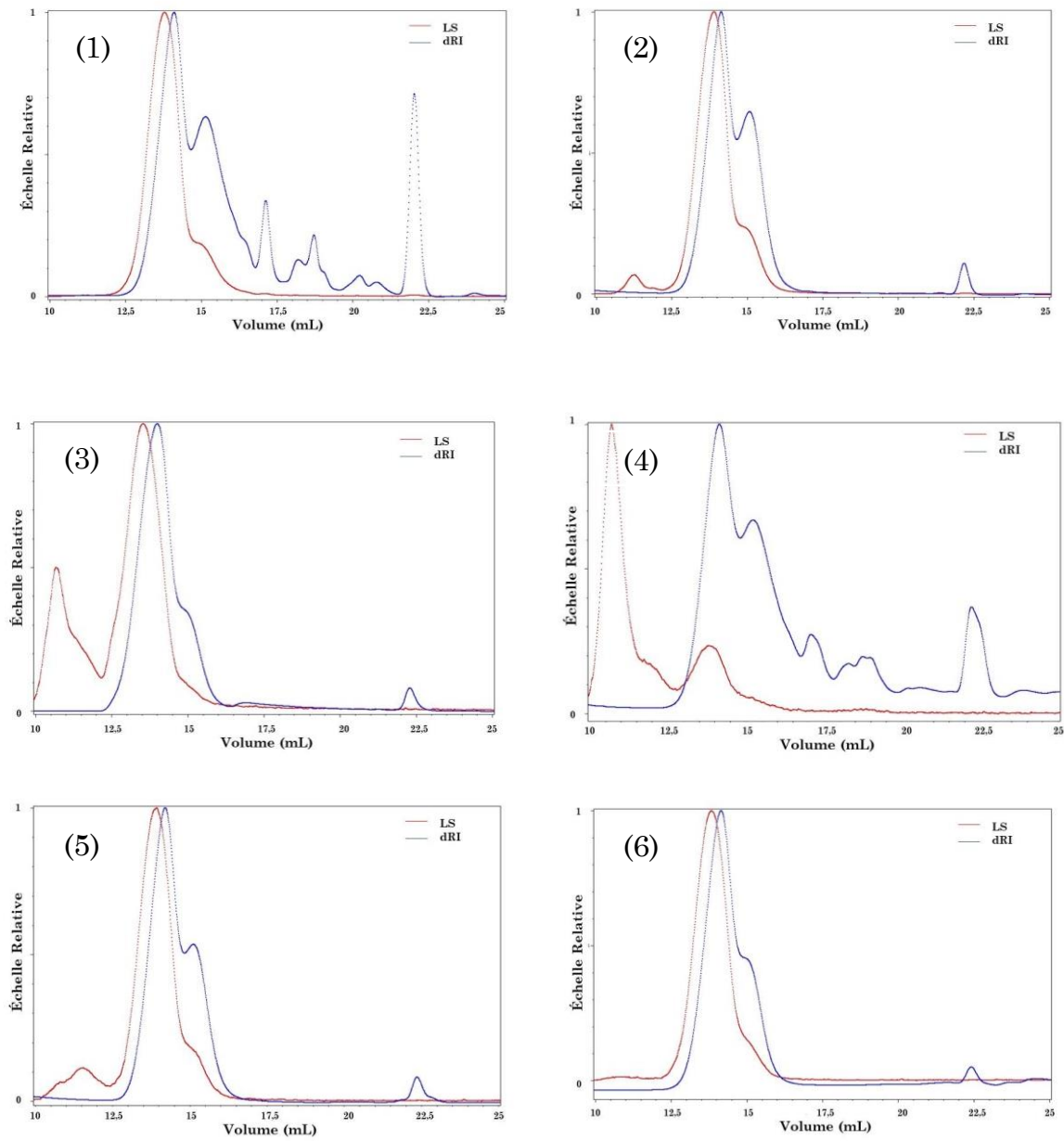
\*En g/100g

\*\*Ascophyscient®

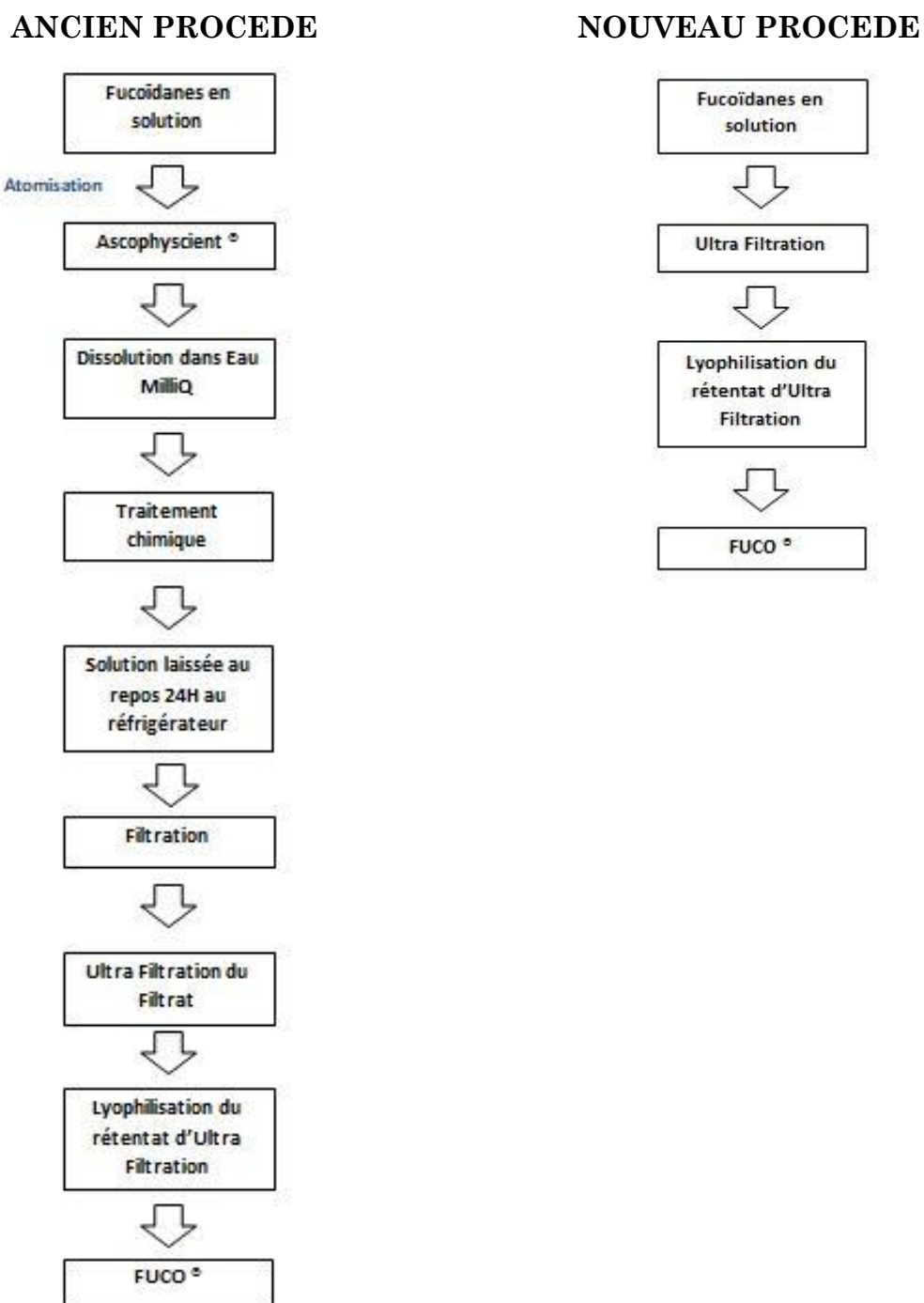
†Comprenant le fucose

À partir de ces résultats, on peut voir que le traitement pH10 n'a d'utilité que sur un produit atomisé car une simple dialyse permet d'obtenir le même degré de purification sur un produit lyophilisé (comparaison produits 5 et 6). Ces résultats sont confirmés par la similitude des chromatogrammes HPSEC-MALLS-dRI des produits purifiés par traitement pH10 (produits 2 et 5) ou par dialyse (produits 3 et 6) comme présenté sur la Figure 3.19. Ces observations ont permis de valider la modification du procédé de production de fucoïdanes de grade pharmaceutique, dénommés FUCO, en enlevant l'étape de purification par traitement pH10 d'Ascophyscient®, remplacée par une étape d'ultrafiltration de la solution de fucoïdanes avant atomisation. Les Flowcharts de l'ancien et du nouveau procédé sont présentés sur la Figure 3.20.





**Figure 3.19** – Chromatogrammes HPSEC-MALLS-dRI des six LMWF ayant subi ou non un traitement pH10 ou une dialyse.



**Figure 3.20** – Flowcharts de l'ancien et du nouveau procédés de production de FUCO.

### 3.2.3 Production d'un lot clinique

Afin de produire le lot de fucoïdanes destiné aux premiers tests cliniques de l'agent de contraste pour l'imagerie moléculaire en scintigraphie de pathologies athérotrombotiques, un redimensionnement et une relocalisation du matériel au sein de l'entreprise A&M fût nécessaire. En effet, l'entreprise A&M, a contrario du LVTS, était habilitée à produire un fucoïdane de grade pharmaceutique depuis la délivrance en 2015 du label « Matière Première à Usage Pharmaceutique » (MPUP) par l'ANSM pour un FUCO produit à partir d'Ascophyscient® (ancien procédé). Le LVTS a fourni à la société A&M une unité d'ultrafiltration ainsi qu'un lyophilisateur pilote de paillasse afin de produire un lot à usage clinique. Un lot d'une centaine de grammes a été produit en août 2016 en suivant les BPF. Des analyses microbiennes et le taux d'endotoxines ont été mesurés sur l'eau utilisée en production ainsi que sur le produit fini. La composition du FUCO a dû également être déterminée par une entreprise habilitée possédant les labels pharmaceutiques. Tous les rapports d'analyses sont fournis en Annexe E. Le lot clinique a par la suite été transféré à la société DBi-Amatsi pour son conditionnement et pour réaliser des tests de stabilité (tests en cours). Cette entreprise a également produit le kit d'imagerie moléculaire TEMP qui sera injecté chez les premiers patients sains en Janvier 2018 (Figure 3.21) pour le début de l'étude clinique.



**Figure 3.21** – Kit d'injection de l'agent de contraste contenant du FUCO.

La production d'une FF de bas poids moléculaire de grade pharmaceutique a été réalisée à partir de fucoïdanes de grade cosmétique fournis par la société A&M sous le nom d'Ascophyscient®. Cela a été rendu possible par la sécurisation du procédé d'obtention d'Ascophyscient® et par l'optimisation du procédé de purification développé par le LVTS. Ce travail a permis la labellisation MPUP du FUCO par l'ANSM, conduisant au développement clinique de phase 1 de l'agent de contraste utilisant ces fucoïdanes.

Cependant, l'origine des bioactivités de ces fucoïdanes reste non résolue, notamment la liaison à la P-sélectine dont l'affinité avec les LMWF est à la source du développement de l'agent de contraste. Afin d'établir des relations structure-activité et d'identifier les espèces macromoléculaires bioactives, l'affinité à la P-sélectine mais également à d'autres biomarqueurs comme les E- et L-sélectines ainsi qu'au VEGF, de fractions de fucoïdanes obtenues par chromatographie d'échange d'ions (IEC) ainsi que des LMWF bruts ont été mesurées par une technique faisant appel aux technologies SAW et SPR. Ces travaux sont présentés dans le Chapitre 4 de ce manuscrit.

# *Chapitre 4*

---

Identification des espèces bioactives

---



## 4. Identification des espèces bioactives.

---

Nous avons souligné dans la première partie de ce mémoire l'importance des sélectines dans les pathologies vasculaires et plus particulièrement celle de la P-sélectine.

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité des fucoïdanes (plus particulièrement les fucoïdanes de bas poids moléculaire) à lier fortement la P-sélectine en mimant l'interaction de la protéine avec son principal ligand, la PSGL-1 [3, 91]. L'affinité nanomolaire du fucoïdane pour la P-sélectine a conduit au développement d'agents de contraste ciblant la P-sélectine plaquettaire (thrombose) et endothéliale (ischémie) par imagerie TEMP ou IRM [198, 200, 235]. Il a également été démontré que les fucoïdanes possédaient une forte affinité pour le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ainsi que pour son récepteur naturel (VEGFR2) [17, 103, 183, 184].

De nombreuses publications ont démontré l'importance du degré de sulfatation ainsi que celle de la masse molaire pour certaines bioactivités des fucoïdanes [129, 133, 145, 282, 283]. Cependant, aucune étude concluante n'a été réalisée concernant les relations structure-activité de leur capacité de liaison à la P-sélectine.

Afin d'obtenir des informations sur ces relations, l'affinité de fractions de fucoïdanes obtenues par chromatographie échangeuse d'ions et possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes a été testée avec des biomarqueurs (la P-sélectine, le VEGF mais également deux autres biomarqueurs de pathologies athérotrombotiques : la E- et la L-sélectine), en utilisant la résonance plasmonique de surface (Surface Plasmon Resonance : SPR) ainsi que les ondes acoustiques de surface (Surface Acoustic Wave : SAW). Ces deux techniques permettent d'obtenir des informations sur la cinétique des interactions entre un récepteur et son ligand, qu'ils soient de nature protéique, lipidique, cellulaire ou de simples molécules.

## 4.1. Fractionnement d'Ascophyscient®

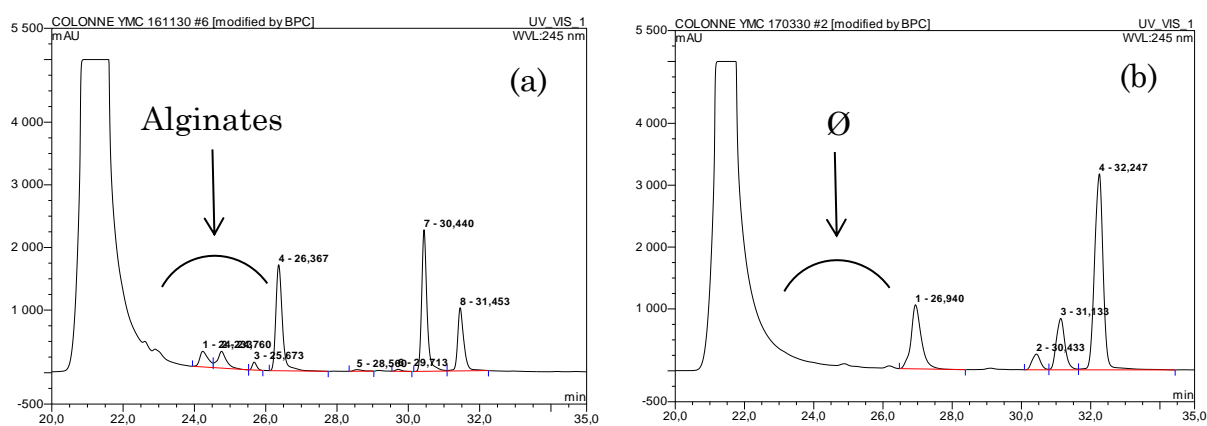
Dans le but d'identifier les espèces bioactives présentes dans Ascophyscient®, un fractionnement par chromatographie échangeuse d'ions (IEC) avec une colonne remplie de gel de DEAE-cellulose portant des charges positives (groupements amines chargés) a été réalisé sur un lot afin de séparer les espèces riches en sulfates d'éventuelles autres familles macromoléculaires. Au final, deux fractions ont été obtenues, une fraction IEC1 possédant très peu de fucoses et de sulfates et une fraction IEC2 très riche en fucoses sulfatés. La composition chimique des deux fractions est présentée dans le Tableau 4.1.

**Tableau 4.1** – Compositions chimiques des fractions IEC1 et IEC2.

Fraction	$\overline{Mw}$ (kDa)	$\overline{Mw}/\overline{Mn}$	%Fuc.*	%Sulf.*	%Xyl.*	%Gal.*	%Man.*	%Ac. Gluc.*
IEC1	8,7 ± 0,1	1,69	9,7 ± 0,2	4,4 ± 0,1	13,6 ± 0,1	-	6,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1
IEC2	13,0 ± 0,1	1,57	42,1 ± 1,3	35,2 ± 1,2	7,5 ± 0,1	2,9 ± 0,1	-	-

\*En g/100g

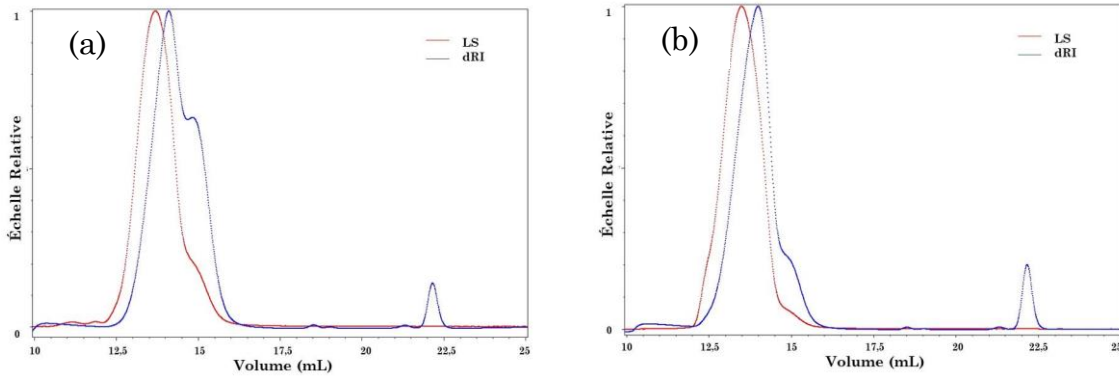
Les compositions des deux fractions sont très différentes. Par ailleurs, la fraction IEC1 concentre les alginates (tr = 24-26 min, Figure 4.1, (a)) contrairement à la fraction IEC2 où ils ne sont pas présents, comme démontré sur les chromatogrammes HPLC (Figure 4.1, (b)).



**Figure 4.1** – Chromatogrammes HPLC des fractions IEC1 (a) et IEC2 (b).



Enfin, le chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI de la fraction IEC2 (Figure 4.2, (b)) ne présente plus qu'une seule population contrairement à la fraction IEC1 (Figure 4.2, (a)) qui présente toujours les deux populations macromoléculaires comme pour Ascophyscient® avec cependant une augmentation notable du signal réfractométrique de la population 2.

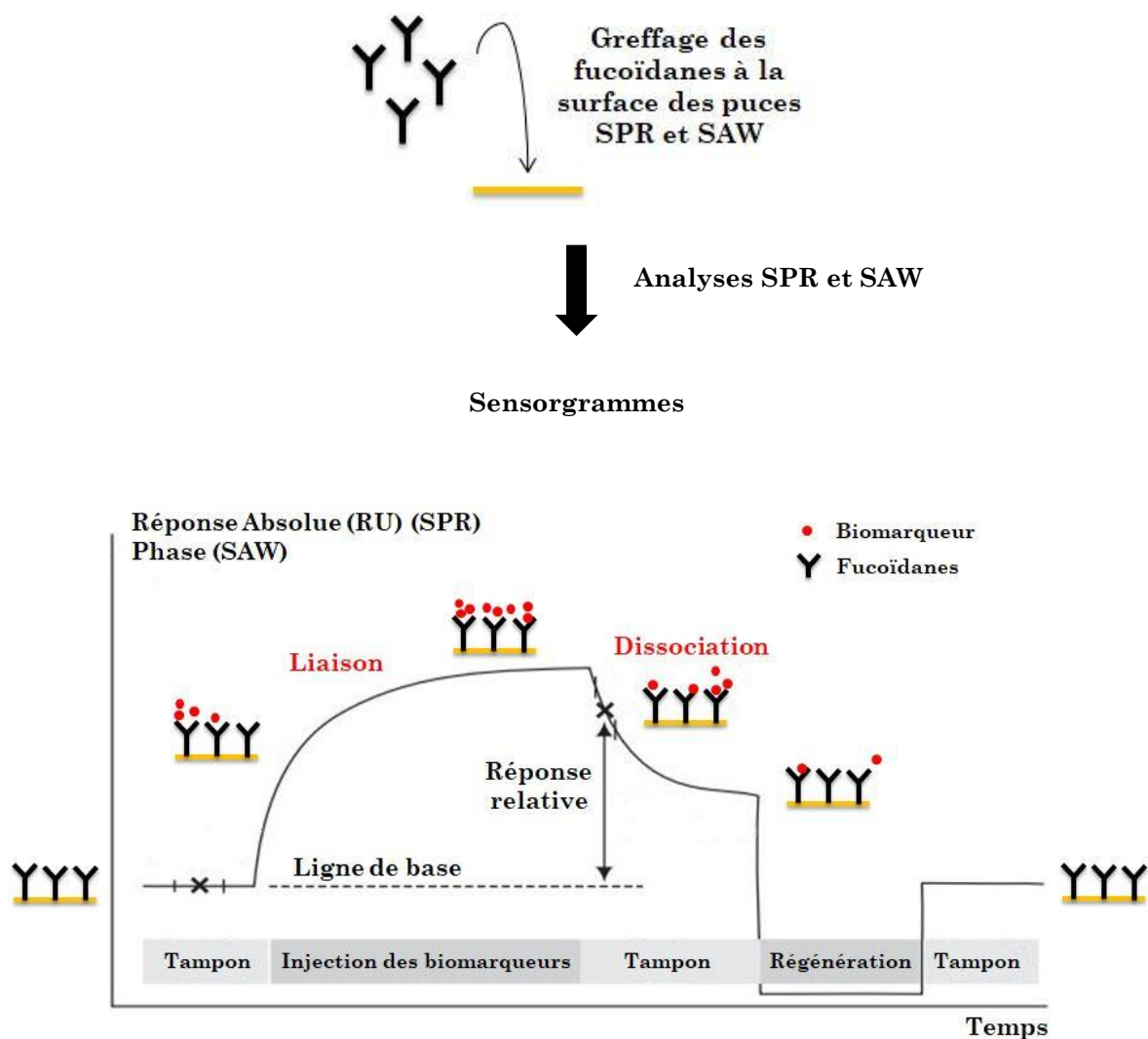


**Figure 4.2** – Chromatogrammes HPSEC-MALLS-dRI des fractions IEC1 (a) et IEC2 (b).

## **4.2. Détermination de l'affinité des fractions de fucoïdanes avec des biomarqueurs.**

Une première estimation de l'interaction entre une fraction de fucoïdane de 7 kDa et la P-sélectine a été réalisée par Bachelet *et al.* en 2009 en utilisant la SPR (Figure 4.3). Le principe physique de la SPR repose sur une mesure de l'augmentation de la masse du revêtement de la puce lorsque l'espèce circulante se lie à ce revêtement. Il est donc plus pertinent d'immobiliser sur la surface de la puce le partenaire le plus léger et de mettre en circulation le plus lourd. Pour des raisons pratiques, les premières expériences au laboratoire ont été réalisées en immobilisant la P-sélectine (MW=72 kDa) et en mettant le fucoïdane (MW= 5-7 kDa) en circulation [3]. Le traitement du signal s'étant avéré difficile du fait de la faible prise de masse, nous avons entrepris pour notre étude de greffer le fucoïdane sur la puce et de mettre en circulation une chimère de la P-sélectine soluble en milieu physiologique et préservant le site d'interaction avec le PSGL-1. Afin de ne pas altérer la structure de la chaîne macromoléculaire, le greffage ne peut s'effectuer que par l'extrémité réductrice du fucoïdane. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour préparer des NPs d'oxyde de fer recouvertes de fucoïdane permettant une imagerie moléculaire en IRM de l'athérombose dans un modèle de rat [235].

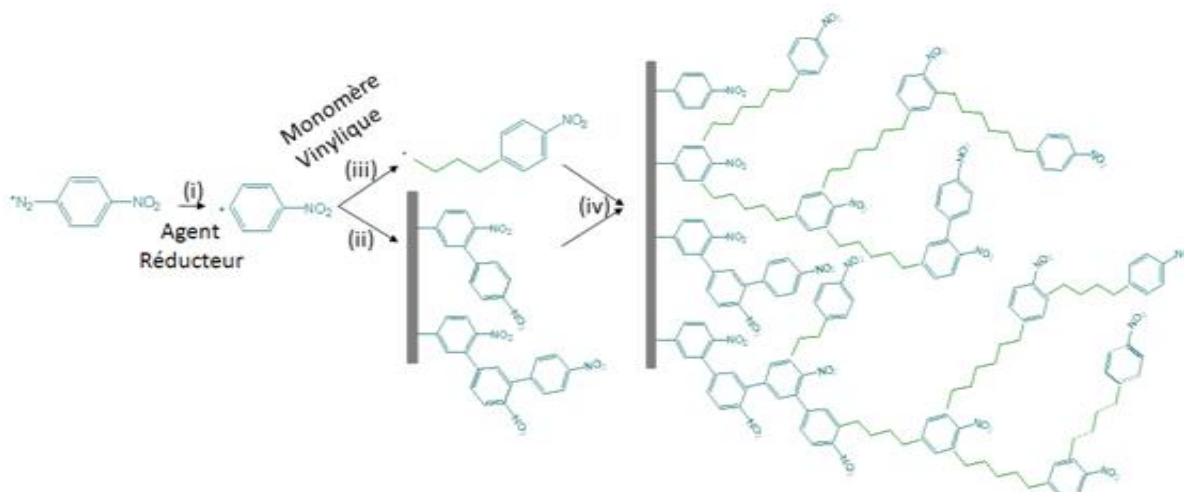
En complément de la SPR, nous avons utilisé la technologie SAW (Figure 4.3). Cette technique, basée sur la détection de décalage de phase d'ondes acoustiques de surface, permet la détection des événements de liaison/dissociation de récepteurs et leurs ligands ainsi que d'obtenir les paramètres cinétiques de ces interactions. Par ailleurs, la technologie SAW, au contraire de la SPR, autorise l'utilisation d'objets circulants de beaucoup plus grosse dimension (NPs, microparticules, cellules, etc.) permettant ainsi d'observer les interactions des fucoïdanes avec des plaquettes ou des cellules endothéliales activées dans de futurs travaux.



**Figure 4.3** – Allure type des sensorgrammes obtenus par analyses SPR et SAW, adapté de [284]. Les technologies SPR et SAW permettent l’enregistrement en temps réel des étapes d’association et de dissociation entre des molécules immobilisées à la surface des puces et des ligands circulant dans une phase mobile à son contact. Les molécules immobilisées tout comme les ligands peuvent être par exemple des sucres, des protéines, des lipides, des acides nucléiques, mais aussi des composés synthétiques ou encore des cellules. Les enregistrements (sensorgrammes) obtenus fournissent des informations sur la cinétique de l’interaction permettant d’estimer l’affinité entre l’espèce immobilisée et l’espèce circulante [285]. Les biomarqueurs sont souvent immobilisés à la surface de la puce à l’aide d’anticorps ou par des méthodes de couplage chimiques, comme par exemple la formation d’une liaison amide entre une fonction carboxylique greffée sur la puce et une amine primaire portée par le ligand circulant [286].

### 4.3. Fonctionnalisation des puces SPR et SAW.

Pour que l'interaction soit efficace il faut aussi un nombre important de structures exposées à la surface de la puce. Nous avons choisi pour cela d'utiliser la technologie de modification de surface GraftFast®. Cette technologie développée par le CEA en 2006 est basée sur le greffage redox de sels d'aryl-diazonium sur une surface permettant d'initier la polymérisation radicalaire de monomères vinyliques (Figure 4.4) [287, 288].



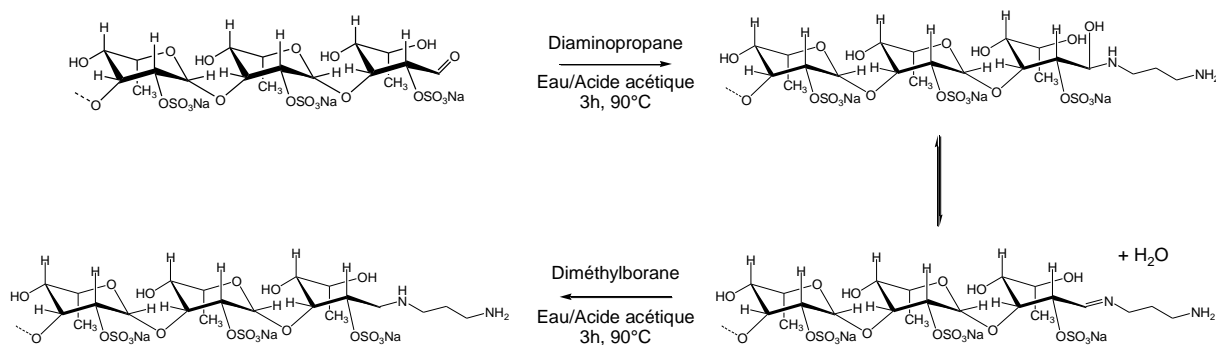
**Figure 4.4** – Mécanisme chimique de construction d'un film GraftFast®. (i) Formation du radical à partir de sels de d'aryl-diazonium, (ii) Greffage du radical sur la surface, (iii) Transfère du radical sur le monomère vinylique, (iv) Croissance du revêtement polymère. Adapté de [287, 288].

Ce procédé conduit à la formation de polymères en brosse à la surface de matériaux conducteurs, semi-conducteurs ou isolants. Il consiste en une réaction à une seule étape, rapide et réalisée à pression atmosphérique en milieu aqueux, permettant la création de films polymère fins, stables, homogènes et liés covalentement au substrat [289]. La technologie GraftFast® a déjà été employée dans de nombreux domaines : traitement des métaux lourds dans les déchets [290], création de biosensors [290], recouvrement de nanomatériaux [291], immobilisation de nanomatériaux [292], métallisation de polymères [293], impression d'électroniques [293]. Il a également été démontré que le procédé GraftFast® peut être réalisé dans l'eau, à température ambiante avec des agents réducteurs biologiques comme l'acide L-ascorbique, rendant ainsi le procédé compatible avec des applications dans le domaine biomédical. Un grand nombre de matériaux ont été modifié par cette méthode : des métaux [287, 294] (or, nickel, titanium, etc.), des plastiques [287, 288, 293] (polyacrylonitrile, polystyrène, polycarbonate, PTFE, etc.), des nanotubes de carbone, des nanoparticules de  $SiO_2$  [289], des biomatériaux [294, 295] ou des structures

organométalliques [296] entre autres. La simplicité de cette technique de greffage a également conduit au développement industriel de micro- et nanomatériaux modifiés par des aryldiazoniums [297].

La méthode de greffage employée dans notre étude diffère de la technologie GraftFast® par la méthode d'amorçage de la polymérisation. A la place d'un agent réducteur, nous avons utilisé une méthode électrochimique par voltampérométrie cyclique qui permet dans un premier temps de contrôler la polymérisation à la surface des puces à l'aide des voltamogrammes et dans un second temps, de contrôler l'épaisseur du film en fixant un nombre de cycles d'oxydation-réduction. La voltampérométrie cyclique consiste à appliquer une rampe de potentiel (+0,5V → -1,5V) à une vitesse de balayage  $v = 50$  mV/s constante, partant, en général d'un potentiel où aucune réaction n'a lieu, pour ensuite atteindre un potentiel où une réaction d'oxydo-réduction a lieu à l'électrode. De même, un balayage retour jusqu'au potentiel initial est effectué. La surface d'or des puces SPR est utilisée comme électrode de travail, apportant à chaque cycle des électrons permettant la polymérisation à sa surface.

Afin de greffer le fucoïdane covalamment sur les puces par ce procédé, une synthèse en deux étapes a été réalisée pour coupler un acide méthacrylique à son extrémité réductrice. La première étape a consisté en une amination réductrice en milieu aqueux avec du 1,3-diaminopropane afin d'obtenir une amine libre à l'extrémité des chaînes polysaccharidiques comme présenté sur la Figure 4.5.

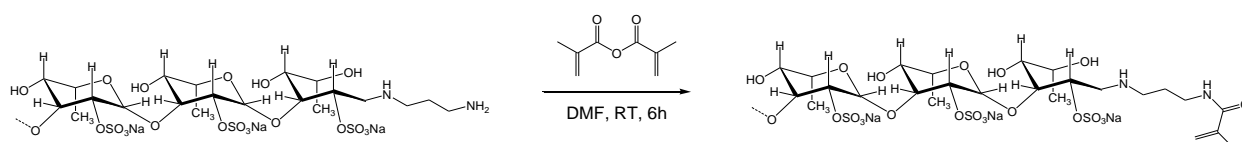


**Figure 4.5** – Schéma réactionnel de l'amination réductrice des fucoïdanes avec du 1,3-diaminopropane [3].

Cette étape a également permis d'ajouter une fonction alkyl au bout des chaînes, jouant le rôle de bras et permettant aux polysaccharides de garder une liberté de mouvement une fois immobilisés à la surface des puces. L'efficacité de la réaction est contrôlée par dosage colorimétrique des amines libres sur les produits.

Dans le but d'optimiser les conditions réactionnelles et d'améliorer les rendements, j'ai pu encadrer un stagiaire M2 pour le développement d'un protocole de synthèse de fucoïdanes aminés à l'aide de liquide ionique (LI). Les résultats de ces travaux sont présentés en Annexe G.

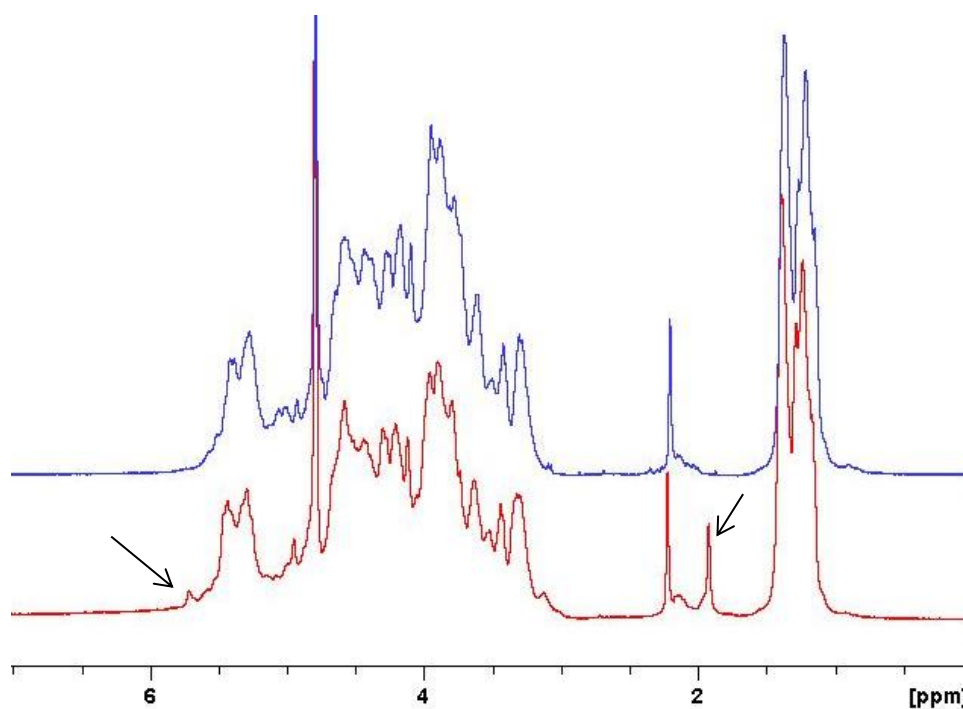
La deuxième réaction a conduit à la formation de produits possédant une fonction méthacrylate à leur extrémité. Les produits possédant une amine libre terminale ont été mis en suspension dans du DMF jouant par la même occasion le rôle de base faible. De l'anhydride méthacrylique est alors ajouté à la solution pour former les composés méthacrylés comme présenté sur la Figure 4.6.



**Figure 4.6** – Schéma réactionnel de la méthacrylation des fucoïdanes avec de l'anhydride méthacrylique.

Par ailleurs, la présence des groupes méthacrylates a été attestée par RMN <sup>1</sup>H (Figure 4.7) avec l'apparition d'un doublet à environ 5,7ppm correspondant à l'un des protons sur la double liaison et un pic à 1,8ppm correspond au groupement méthyl porté par la double liaison des méthacrylates. Le taux de méthacrylation a été estimé par dosage colorimétrique des amines libres restantes.

Un lot d'Ascophyscient®, les deux fractions d'IEC ainsi que du Dextrane T10, un polysaccharide composé de glucose ayant pour masse molaire 10 kDa, ont par la suite été modifiés chimiquement afin de les greffer à la surface des puces SPR et SAW.



**Figure 4.7** – Spectres RMN 1H (99,8% D2O, 500MHz) d’Ascophyscient® dialysé en bleu et d’Ascophyscient® dialysé méthacrylé en rouge. Les flèches indiquent les signaux attribués à la fonction méthacrylate.

On retrouve l’apparition de ces pics sur les fractions IEC1, IEC2 et sur le Dextrane T10. Les spectres sont présentés en Annexe F. Les rendements de réaction de l’amination ainsi que de la méthacrylation sont présentés dans le Tableau 4.2.

**Tableau 4.2** – Rendements des réactions d’amination et de méthacrylation.

Produit	%Amines libres après amination réductrice*	%Amines libres après méthacrylation*	%Fucoïdanes méthacrylés**
Ascophyscient®	99%	33%	66%
IEC1	99%	21%	78%
IEC2	54%	11%	43%
Dextrane T10	89%	5%	84%

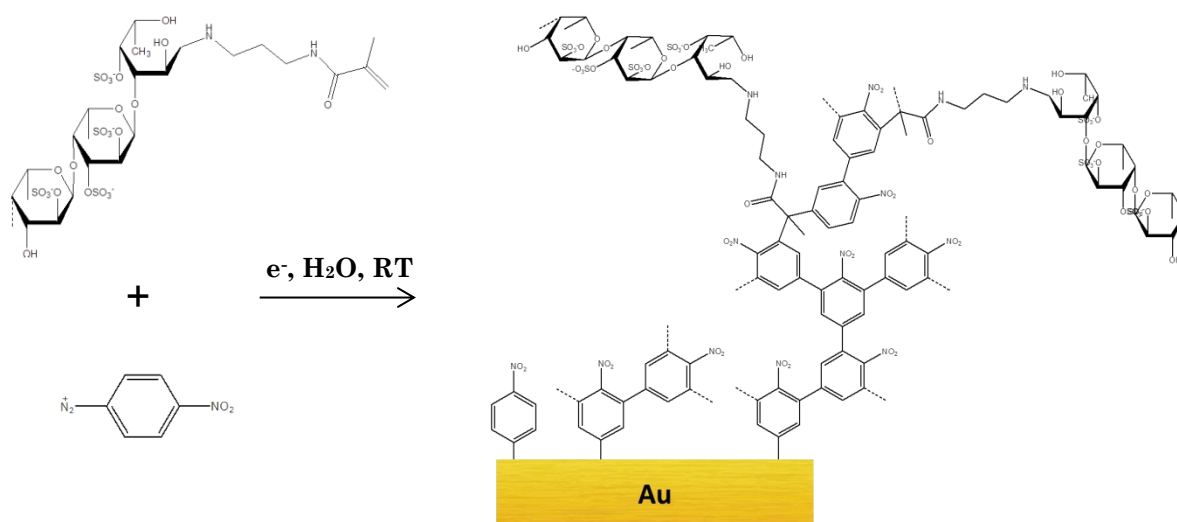
\*En nombre de chaînes aminées/nombre de chaînes

\*\*%amines libres - %amines libres après méthacrylation

On peut voir des différences sur le % de fucoïdanes méthacrylés entre les différents produits. Ces différences n’ont que peu d’importance du fait que les polysaccharides sont introduits en large excès lors du greffage. Les molécules ne possédant pas de fonction méthacrylate à leur extrémité réductrice ne peuvent pas polymériser et sont éliminées lors de l’étape de rinçage post-polymérisation de la puce.

#### 4.4. Greffage des polysaccharides méthacrylés sur les puces SPR et SAW.

Les polysaccharides méthacrylés ont été immobilisés de manière covalente sur la surface d'or des puces SPR par polymérisation radicalaire électro-amorcée, en présence de sels de diazoniums (Figure 4.8). Le procédé électrochimique utilisé, la voltampérométrie cyclique, a permis de former les radicaux dans des conditions douces et progressives et de suivre le processus de polymérisation au cours du temps (Figure 4.9).



**Figure 4.8** – Fonctionnalisation des puces SPR par polymérisation radicalaire électro-amorcée de polysaccharides méthacrylés.

La diminution de l'intensité du courant observée sur les voltamogrammes après chaque cycle d'oxydo-réduction est due à la passivation de l'électrode métallique (puce SPR), indiquant la création d'un film moins conducteur que l'or à sa surface. La polymérisation radicalaire a donc lieu avec les quatre polysaccharides testés. Sur le voltamogramme (a), correspondant à la polymérisation des sels de diazoniums seuls, la présence du pic de réduction à un potentiel proche de  $-0,2$  V correspond à la réduction du sel de diazonium  $Ar-N_2^+$  en radical  $Ar^\bullet$ , confirmant la formation des radicaux nécessaires pour amorcer la polymérisation. Ce pic est retrouvé sur les autres spectres avec une plus faible intensité. Sur les voltamogrammes (b), (c) et (d) correspondant respectivement à Ascophyscient®, IEC1 et IEC2, un deuxième pic de réduction à un potentiel de  $-1,0$  V et un pic d'oxydation vers  $+0,25$  V apparaissent (notamment sur (b)). Les espèces réduites ne peuvent cependant pas être identifiées à l'aide des voltamogrammes seuls. Enfin, l'augmentation du courant cathodique, observée à un potentiel de  $-1,5$  V sur les voltamogrammes (c) et (d), correspond à la réduction des protons en hydrogène. L'absence de cette augmentation sur

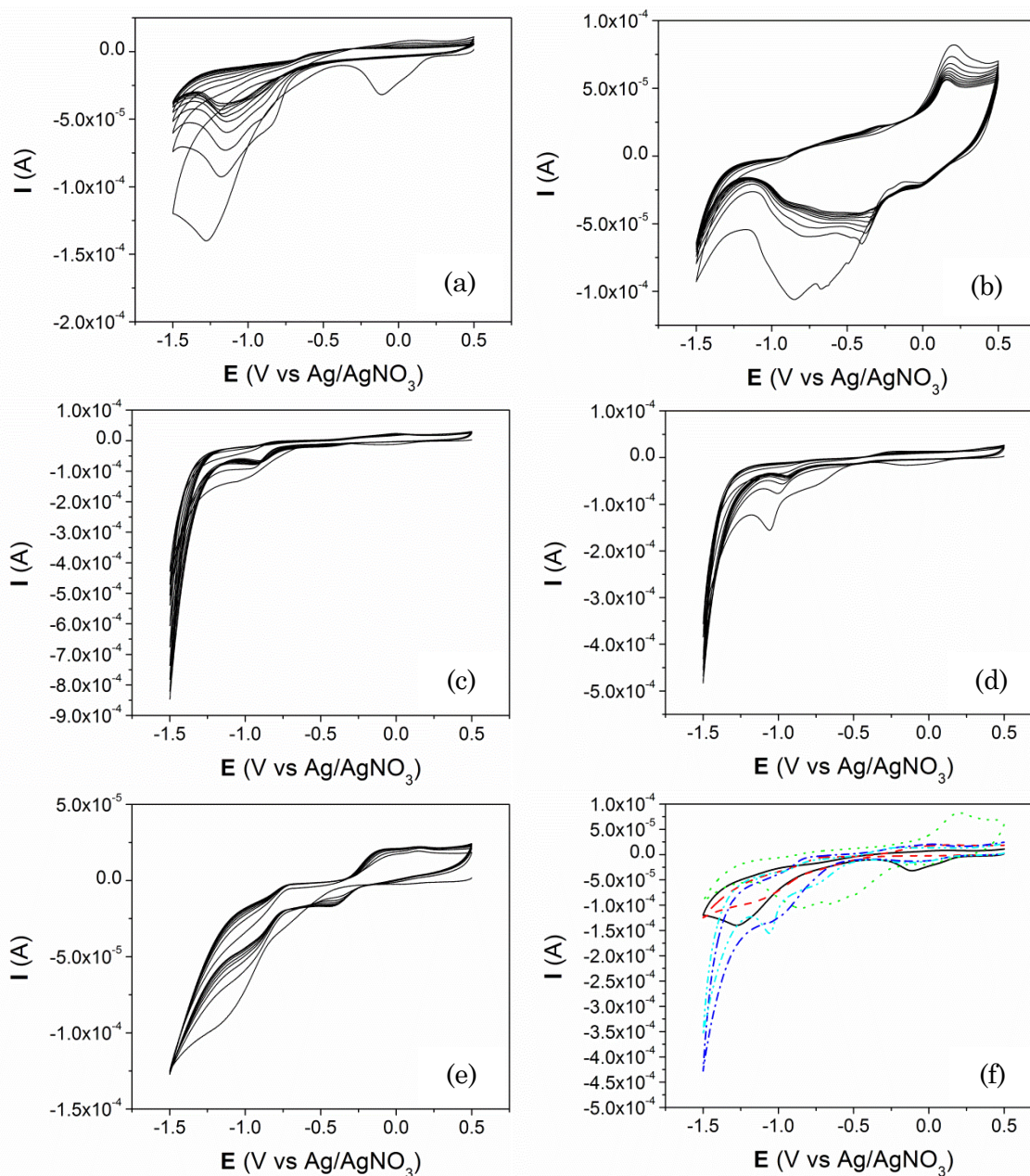


certaines voltammogrammes peut être expliquée par l'utilisation d'une pseudo-référence Ag/AgNO<sub>3</sub>. Le faible volume de solution ( $\approx 100 \mu\text{L}$ ) nécessaire pour le greffage ne permet pas d'utiliser une référence classique (comme l'ECS) avec une garde et un fritté. Dans ces conditions, l'électrode de référence est sensible aux espèces générées en solution et pouvant s'absorber à leur surface, et ne maintient pas un potentiel constant.

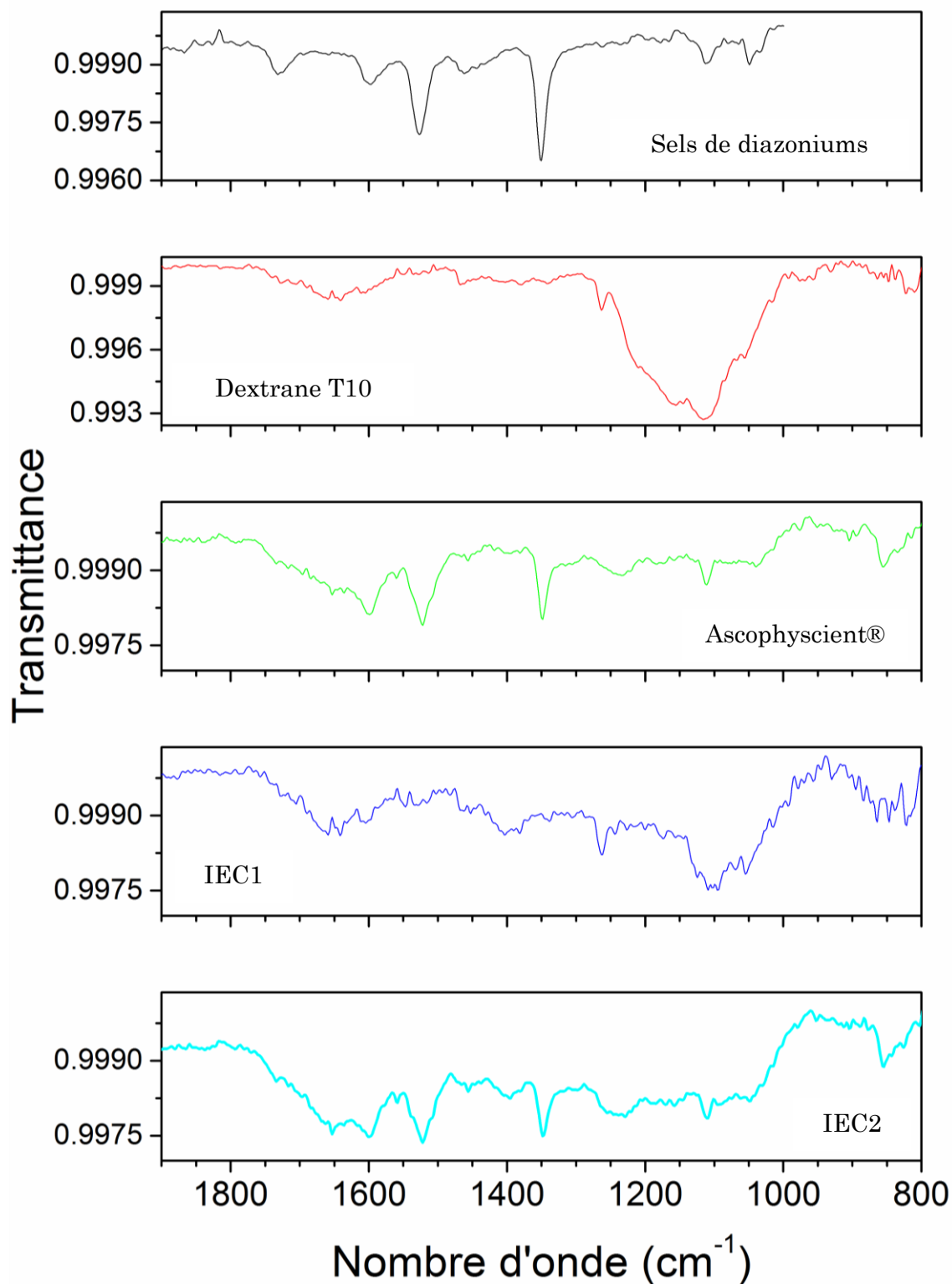
Afin de confirmer la présence des polysaccharides à la surface des puces, des analyses par spectroscopie Infra-Rouge par Réflexion Totale Atténuée (IR-ATR) ont été réalisées. Ces analyses n'ont pu être réalisées qu'avec les puces SAW, les puces SPR étant trop petites et trop fragiles. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.10.

Les trois bandes caractéristiques des groupements nitrophényles à  $1350 \text{ cm}^{-1}$  (vibration NO<sub>2</sub>),  $1530 \text{ cm}^{-1}$  (vibration NO<sub>2</sub>) et  $1600 \text{ cm}^{-1}$  (vibration C=C) sont retrouvées sur les spectres IR-ATR des puces fonctionnalisées. Ces bandes sont plus intenses sur les puces modifiées par Ascophyscient® et par la fraction IEC2, indiquant une forte proportion de diazoniums à la surface des puces. Par ailleurs, on retrouve la bande correspondant à la vibration des liaisons S=O autour de  $1250 \text{ cm}^{-1}$  sur les spectres des puces fonctionnalisées par Ascophyscient®, IEC1 et IEC2, trahissant la présence de fucoïdanes à leurs surfaces. Enfin, la large bande entre  $1000 \text{ cm}^{-1}$  et  $1300 \text{ cm}^{-1}$  retrouvée avec le Dextrane T10 est présente sur les spectres FT-IR du dextrane. Elle regroupe les bandes correspondant aux vibrations C-O, C-C, CCH, HCO et C-O-C du pyranose [298, 299].

Enfin, des expériences de greffage utilisant des fucoïdanes méthacrylés et la technologie GraftFast® ont été conduites sur des NPs de PLGA. Les résultats préliminaires de cette étude sont présentés en Annexe H.



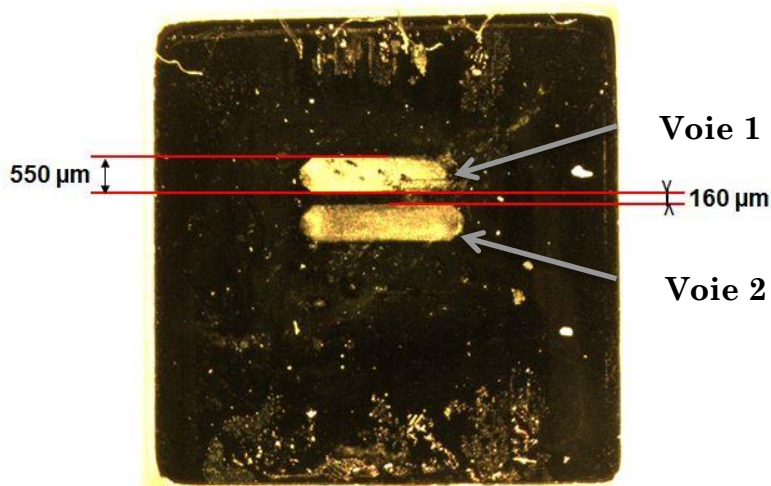
**Figure 4.9** – Voltamogrammes des greffages de (a) sels de diazoniums, (b) Ascophyscient®, (c) IEC1, (d) IEC2 et (e) Dextrane T10. La figure (f) représente la superposition des premiers cycles d’oxydo-réduction de chaque produit : en noir les sels de diazoniums, en vert Ascophyscient®, en bleu foncé IEC1, en bleu clair IEC2 et en rouge le Dextrane T10.



**Figure 4.10** – Spectres IR-ATR des puces SAW fonctionnalisées par : en noir les sels de diazoniums, en rouge le Dextrane T10, en vert Ascophyscient®, en bleu foncé IEC1, en bleu clair IEC2.

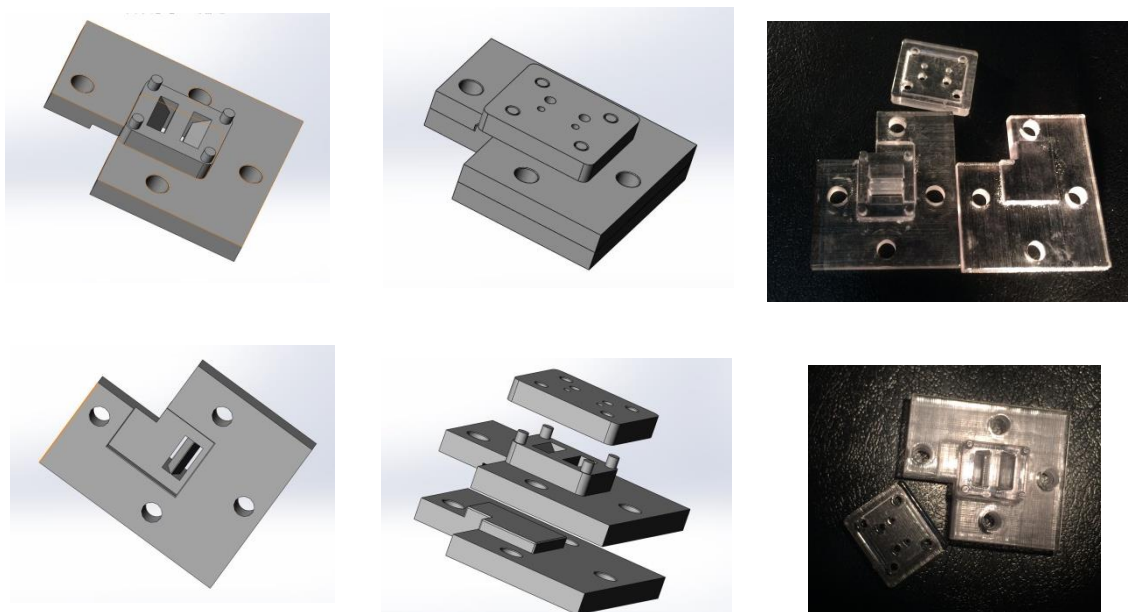
## 4.5. Analyses SPR

Les analyses SPR ont été réalisées avec un Biacore X100 (GE HealthCare Europe, GmbH, Freiburg, Allemagne). Cet appareil permet la lecture de deux voies, la première étant réservée pour la référence. Cependant, les deux voies sur la puce ne sont séparées que de 160  $\mu\text{m}$  pour une hauteur de 550  $\mu\text{m}$ , rendant leur différenciation impossible avec la cellule électrochimique utilisée pour faire les greffages (Figure 4.11).



**Figure 4.11** – Photo des voies d'une puce SPR.

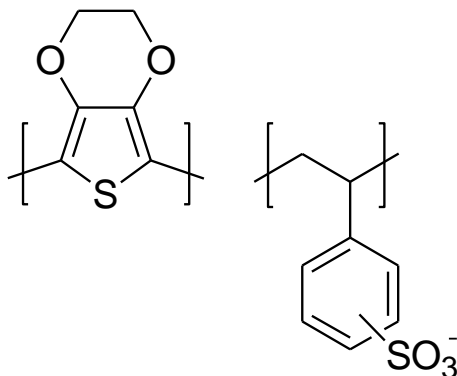
Afin de contourner ce problème, plusieurs techniques ont été employées. La première a consisté au développement d'un moule à l'aide de l'impression 3D possédant deux cellules électrochimiques (puits) pour séparer les deux voies et permettre le greffage de Dextrane T10 sur la voie de référence et une fraction de fucoïdane sur l'autre voie (Figure 4.12).



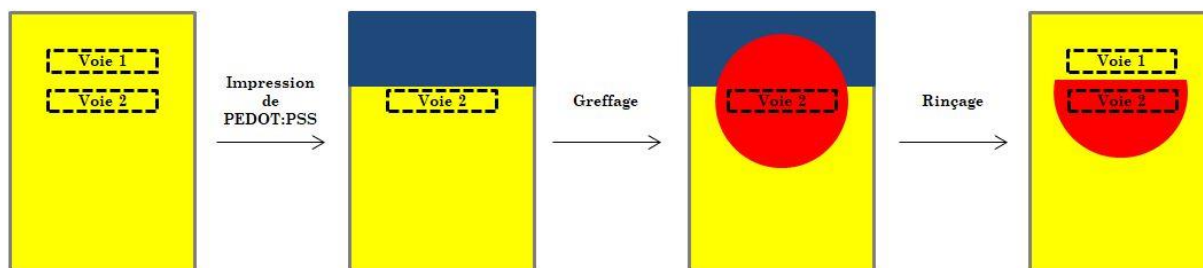
**Figure 4.12** – Schémas en 3D et photos du moule. Schémas obtenus avec le logiciel SolidWorks®.

De nombreux essais ont été réalisés avec différents moules mais les résultats n'ont jamais été concluants, des fuites apparaissaient lors de l'ajout de l'électrolyte dans les puits.

Par la suite, une autre méthode a été employée pour laisser nue la voie de référence (utilisation de l'or comme référence). Un polymère composé de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDOT) et de poly(styrène sulfonate) de sodium (PSS) a été déposé par impression sur la voie de référence. Ensuite, le polysaccharide d'intérêt a été greffé sur la puce puis le PEDOT:PSS a été retiré par rinçages successifs à l'eau, à l'éthanol, à l'acétone et au DMF dans un bain d'ultrasons (Figure 4.14).



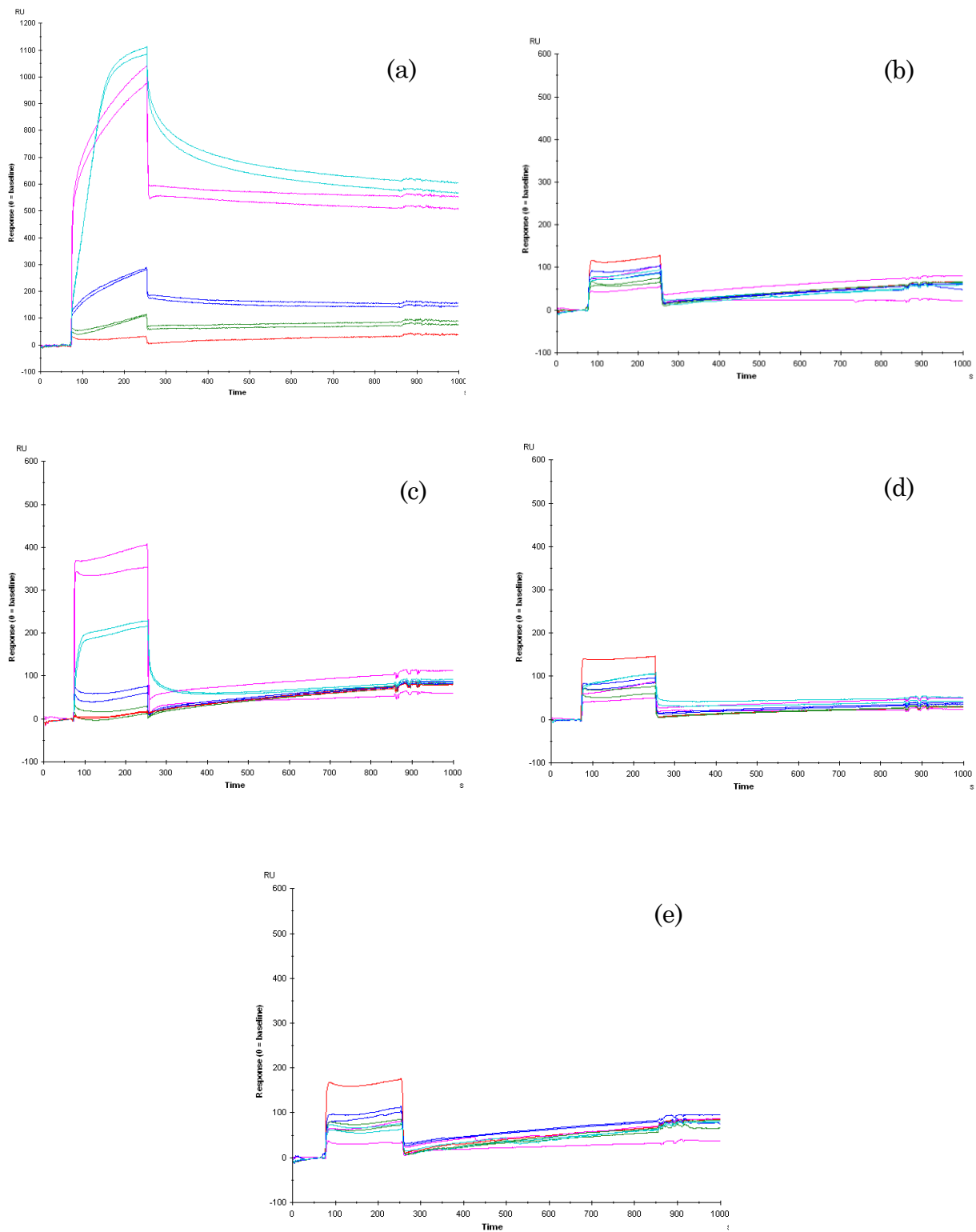
**Figure 4.13** – Composition du PEDOT:PSS.



**Figure 4.14** – Schéma de greffage de polysaccharides (en rouge) sur une puce SPR après dépôt de PEDOT:PSS (en bleu).

Les résultats obtenus avec cette puce n'ont pas permis de différencier les voies. Le polysaccharide greffé a été identifié sur les deux voies après des analyses SPR. Par la suite, cinq puces SPR ont été fonctionnalisées avec cinq produits (Ascophyscient®, IEC1, IEC2, Dextrane T10 et sels d'aryl-diazoniums seuls) sans différencier les voies 1 et 2. De ce fait, les paramètres cinétiques de l'interaction des polysaccharides avec les biomarqueurs étudiés n'ont pas pu être quantifiés mais la comparaison de l'allure des courbes d'interactions sur les sensorgrammes a permis dans un premier temps de confirmer la présence des fucoïdanes à la surface des puces et également de comparer les réponses relatives de chaque fraction.

Quatre biomarqueurs à la même concentration (100nM) ont été injectés : les P-, E- et L-sélectines ainsi que le VEGF. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.15. On peut voir que les fucoïdanes interagissent fortement avec la P-sélectine et le VEGF et faiblement avec la L-sélectine (Figure 4.15, (a)). Ces signaux confirment la présence de fucoïdanes à la surface de la puce car aucun signal n'est observé pour les puces recouvertes de Dextrane T10 ou de sels d'aryl-diazoniums (Figure 4.15, (d) et (e)). Cependant, aucun signal n'est observé pour les fractions IEC1 et IEC2 (Figure 4.14, (b) et (c)). Ces résultats sont sans doute dus à un biais lors de la polymérisation à la surface de la puce, une deuxième série d'expériences est en cours afin de confirmer ou d'affirmer la réponse des fractions IEC1 et IEC2 aux sélectines et au VEGF.

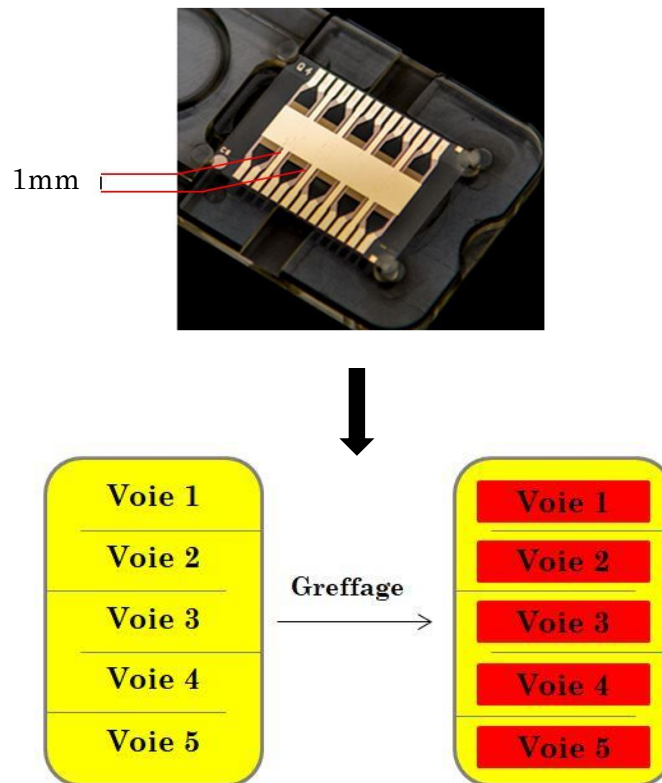


**Figure 4.15** – Sensorgrammes SPR de (a) Ascophyscient®, (b) IEC1, (c) IEC2, (d) Dextrane T10, (e) Sels d'aryl-diazoniums. Signal en rouge : tampon, en rose : P-sélectine, en vert : E-sélectine, en bleu foncé : L-sélectine, en bleu clair : VEGF. Deux signaux sont obtenus correspondant aux deux voies.



## 4.6. Analyses SAW

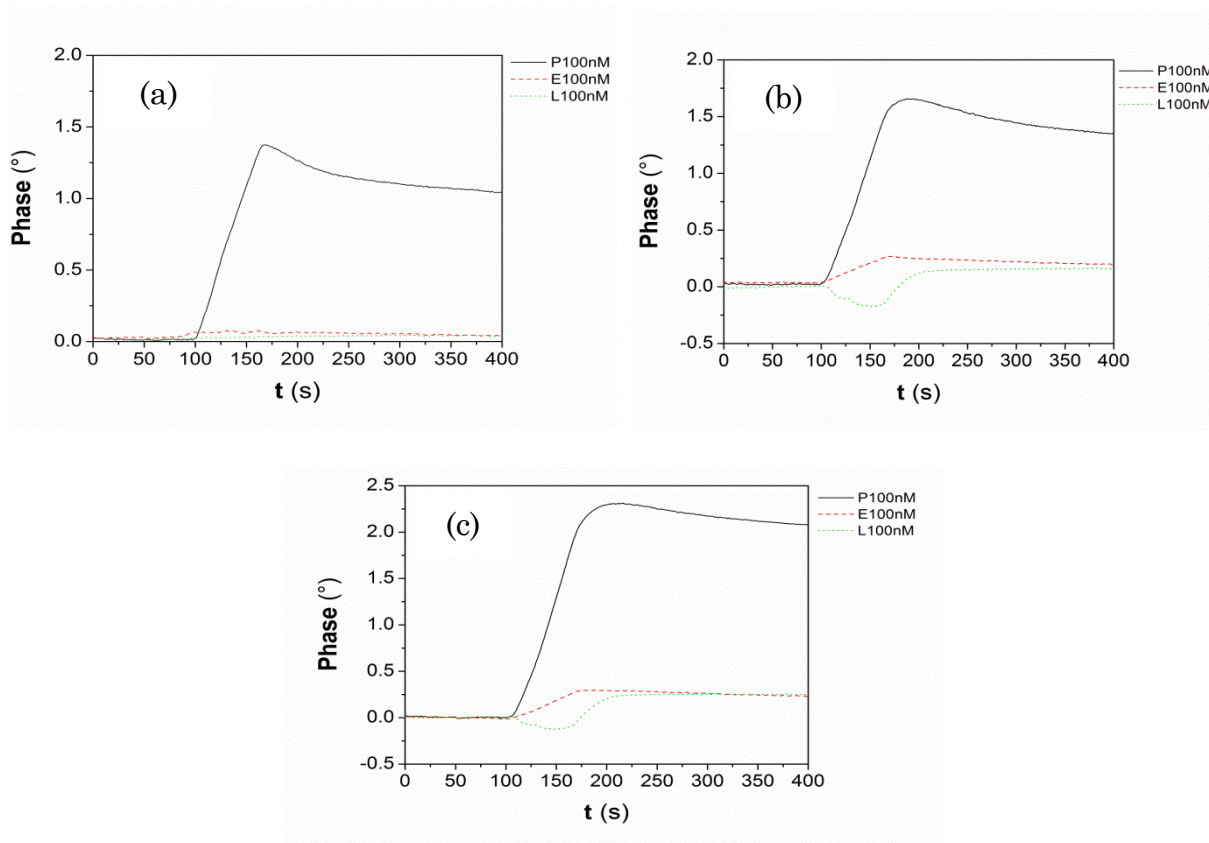
Les puces SAW présentent cinq voies de tailles supérieures à celles de SPR, rendant le greffage des polysaccharides plus aisé. Par ailleurs, le fabricant fournit avec les puces un moule permettant de dissocier les cinq voies pour le greffage (Figure 4.16), permettant ainsi d'avoir sur une seule puce une référence plus quatre molécules différentes.



**Figure 4.16** – Photo et schéma d'une puce SAW. Greffage en une étape des polysaccharides (en rouge).

Les sensorgrammes d'une puce fonctionnalisée avec Ascophyscient®, IEC1 et IEC2 sont présentés en Figure 4.17. Trois biomarqueurs ont été injectés. les P-, E- et L-sélectines.





**Figure 4.17** – Sensorgrammes SAW de (a) Ascophyscient®, (b) IEC1 et (c) IEC2. Signal en noir : P-sélectine, en rouge : E-sélectine, en vert : L-sélectine. Les trois sélectines injectées ont une concentration de 100 nM.

La forte interaction des fucoidanes avec la P-sélectine est une nouvelle fois démontrée. Les fractions IEC1 et IEC2 réagissent également renforçant l’hypothèse d’une erreur de manipulation pour les expériences réalisées en SPR avec ces fractions. On peut noter une affinité légèrement supérieur pour la fraction IEC2 (hauteur du signal à  $\approx 2,5^\circ$  contre  $\approx 1,5^\circ$  pour Ascophyscient® et IEC1).

Cependant, des soucis d’ordre technique, notamment la dégradation des connecteurs entre la puce et l’appareil, ont empêché de réaliser des analyses plus poussées et d’extraire les données cinétiques des interactions observées.



# *Discussion générale*



# Discussion générale

---

La médecine s'intéresse depuis de longtemps aux activités biologiques des polysaccharides. Leur extraction à partir de plantes, d'animaux ou de microorganismes reste la seule méthode effective aujourd'hui car malgré les progrès en synthèse organique et en biotechnologie, il n'est toujours pas possible de réaliser une synthèse totale de polysaccharides de manière efficace, au contraire des deux autres familles de macromolécules naturelles, les protéines et les acides nucléiques. Les activités biologiques des fractions polysaccharidiques de bas poids moléculaire sont souvent identifiées à partir de mélanges partiellement caractérisés ne permettant pas de déterminer aisément les structures bioactives spécifiques [62]. La complexité et la variabilité structurale des fragments dans ces mélanges limitent leur utilisation en pharmacutique ou en nutraceutique et il y a un manque de méthodes industrielles fiables pour leur production. Au-delà de la détermination complète des structures, les principaux obstacles pour le développement de ces produits en santé Humaine sont la production de fractions polysaccharidiques reproductibles à partir d'un matériau brut avec un bon rendement et un protocole fiable qui sont des conditions préalables importantes pour la détermination de relations structure-activité robustes. Ainsi, la réussite du développement de ces composés à l'avenir implique des procédés efficaces pour une production spécifique. Deux stratégies sont disponibles : la synthèse chimique ou enzymatique et le clivage chimique, physique ou biologique des liaisons glycosidiques. Bien que les procédés de synthèse soient de plus en plus efficaces, ils nécessitent des substrats et des protocoles non compatibles (ou peu) avec un développement industriel. Par conséquent, diverses méthodes de dépolymérisation ont été développées : des procédés (bio)chimiques par hydrolyse acide [300], par clivage radicalaire [48, 301] ou par dégradation enzymatique [49, 302] et des procédés physiques par traitement thermique [303], à l'aide de micro-ondes [304], par ultrasons [305] ou par  $\gamma$ -irradiation [306]. En générale, les procédés physiques sont coûteux et nécessitent de l'instrumentation spécifique. Les traitements enzymatiques seraient une bonne alternative pour la production de structures polysaccharidiques spécifiques, cependant, la faible disponibilité des enzymes ne permet pas aujourd'hui d'envisager une production industrielle.

L'obtention de polysaccharides de bas poids moléculaire a donc été principalement réalisée par hydrolyse acide et par dépolymérisation oxydo-réductrice (DOR) à partir de polysaccharides de haut poids moléculaire. Les traitements acides conduisent principalement à la formation de monosaccharides et de sous-produits adverses obligeant la réalisation d'une étape de purification

post-dégradation. Depuis les quarante dernières années, la DOR fût employée sur de nombreux polysaccharides pour générer des fractions de bas poids moléculaire avec une distribution des masses étroite et avec des conditions de réaction douces. De plus, comparé à l'hydrolyse acide, il n'y a pas de clivage préférentiel des chaînes latérales [300] maintenant la structure primaire du polysaccharide de départ après la dépolymérisation [307]. La DOR est principalement réalisée à l'aide de peroxyde d'hydrogène, un oxydant efficace et propre produisant des radicaux hydroxyles hautement réactifs. La DOR a été employée sur de nombreux polysaccharides tels que le chitosane [308], l'amidon [309], la cellulose [310], le dextrane [311], l'héparine [312], le sulfate de dermatane [313] et le fucoïdane [48]. Les conditions de réactions sont douces comparées à l'hydrolyse acide avec des températures inférieures à 100°C et des pH compris entre 4,5 et 9, le plus souvent autour de 7 [301]. Par ailleurs, les réactifs sont peu coûteux et utilisable à grande échelle. Il y a toujours un débat sur le mécanisme réactionnel de la DOR [314] qui reste méconnu dû au grand nombre de molécules impliquées et aux réactions intermédiaires complexes, mais on considère que le nombre d'extrémités réductrices des fragments produits est proportionnel au nombre de clivages [300]. Du fait que les clivages se produiraient de façon aléatoire dans les chaînes polysaccharidiques [314-316], la DOR produit à la fois une diminution de la masse molaire moyenne et un resserrement de la distribution de masse molaire du polysaccharide de départ. La stratégie employée par l'entreprise A&M pour la production efficace et rentable d'une fraction de fucoïdanes de bas poids moléculaire (Ascophyscient®) par DOR est donc cohérente en rapport aux techniques disponibles sur le marché à l'heure actuelle.

De nos jours, seuls deux polysaccharides sont utilisés en santé Humaine : l'acarbose, un tétrasaccharide utilisé contre le diabète de type 2 [317] (Precose, Glucobay; Bayer, Leverkusen, Allemagne) et l'héparine, un glycosaminoglycane largement utilisé pour ses propriétés anti-thrombotiques et anticoagulantes [237]. En particulier, l'héparine de bas poids moléculaire (HBPM) (Lovenox; Sanofi, Gentilly, France) reste le seul polysaccharide utilisé comme agent thérapeutique depuis son premier essai clinique à la fin des années 80 [241]. Les agences de santé ont renforcé la législation concernant les nouveaux produits pharmaceutiques dans les dernières décennies à cause de scandales sanitaires incluant notamment les HBPM [242], rendant impossible l'arrivée sur le marché des fucoïdanes sans une source fiable et des processus industriels robustes. Les fucoïdanes commerciaux utilisés à des fins de recherches, particulièrement de la recherche médicale, doivent être intégralement caractérisés et la reproductibilité attestée avant d'envisager des développements cliniques. Dans notre étude, les fucoïdanes de bas poids moléculaire (Ascophyscient®) obtenus à partir d'extraits bruts d'*Ascophyllum nodosum* ne sont pas des espèces macromoléculaires pures

mais la composition moyenne des dix lots produits de 2012 à 2017 est remarquablement reproductible comme présenté dans le chapitre 3.

Cependant, l'analyse de ces fractions a mis en évidence deux populations macromoléculaires de 13,1 kDa et 2,7 kDa ainsi que des oligosaccharides de masses indéterminées. Par la suite, deux techniques de purification ont été développées dans le but d'éliminer ces oligosaccharides pour obtenir des fractions de fucoïdane pour le développement clinique d'un agent de contraste pour l'imagerie moléculaire de l'athérombose. Les deux techniques de purification n'ont cependant pas permis d'éliminer complètement la seconde population macromoléculaire composée majoritairement d'alginate.

Les alginate sont des polysaccharides composés d'acide mannuronique et guluronique. Ils sont depuis longtemps employés dans l'industrie agro-alimentaire comme gélifiant, épaississant ou émulsifiant ainsi qu'en pharmacie pour la libération contrôlée de molécules actives ou comme matrice en ingénierie tissulaire [318, 319]. Les alginate sont très difficilement dégradables par hydrolyse acide, un traitement standard nécessitant de les laisser de un à dix jours dans de l'acide phosphorique concentré pour obtenir des fractions de bas poids moléculaire [320] expliquant la faible réponse des alginate au dosage HPLC (ne comprenant qu'une hydrolyse de 4h dans du TFA 2M). Néanmoins, il semblerait qu'ils soient présents en quantité non négligeable dans Ascophyscient®. En effet, les analyses élémentaires et surtout l'analyse des cendres par ATG suggèrent que 10 à 20% du produit serait composé d'alginate (cf. Tableau 3.10 : 60% oses + 14,7% sulfates + 10% cendres (ATG) = 84,7% soit 15,3% composés potentiellement d'alginate). Par ailleurs, la forte intensité du signal réfractométrique de la deuxième population observé sur les dix lots d'Ascophyscient® confirme cette approximation. Aucune activité biologique directe n'a encore été imputée aux alginate, cependant, ils sont connus pour être de bons chélatants du calcium [321] dont l'interaction P-sélectine/PSGL-1 est dépendante. L'interaction observée par SAW de la fraction riche en alginate avec la P-sélectine pourrait peut-être s'expliquer par un rôle synergique des espèces composées de fucoses sulfatés avec les alginate qui apporteraient des ions calcium sur les sites de liaison.

Du fait de la présence d'alginate, les masses molaires mesurées pour les deux populations ne sont pas représentatives car l'incrément d'indice de réfraction ( $dn/dc = 0,144$ ), paramètre essentiel pour déterminer ces masses, a été mesuré avec Ascophyscient®. Cet incrément est donc en réalité une « moyenne » de celui des fucoïdanes et de celui des alginate. Thuy *et al.* ont déterminé une valeur de  $dn/dc = 0,119$  pour un fucoïdane extrait de *Sargassum swartzii* [322] alors que celui des alginate serait plus proche de 0,165 [323], la valeur de 0,144 retrouvé pour Ascophyscient® reste donc cohérente. La masse

molaire moyenne de la population 1 serait cependant plus faible que 13,1 kDa et celle de la population 2 plus élevée que 2,7 kDa. Néanmoins, l'étude réalisée ici s'est concentrée sur la reproductibilité des lots, l'erreur réalisée sur le  $dn/dc$  n'a donc pas eu d'impact sur les conclusions tirées puisque le même incrément a été utilisé pour tous les lots comparés. Une mesure d'incrément d'indice de réfraction devra être réalisée sur la fraction ne contenant que des fucoïdanes ou presque, afin de déterminer la valeur réelle du  $dn/dc$  de cette population macromoléculaire.

Les techniques de purification développées par le LVTS ont été optimisées en vue d'un éventuel développement industriel de la production de fucoïdanes de grade pharmaceutique. Comme présenté précédemment, ces techniques n'ont pas permis d'éliminer les alginates présents dans Ascophyscient® mais seulement les sous-produits de la dépolymérisation radicalaire. Bien que la fraction purifiée (dénommée FUCO) ne soit pas composée de fucoïdanes pures, son développement clinique en phase I est rendu possible par sa caractérisation complète. L'ANSM a labellisé le FUCO « matière première à usage pharmaceutique » (MPUP) en 2015. Le dossier IMPD (Investigational Medicinal Product Dossier) est en cours de rédaction, les tests cliniques de l'agent de contraste pour l'imagerie TEMP de l'athérombose commenceront en janvier 2018 sur des patients sains. Dans le cas du succès de l'étude clinique de phase I, le produit peut être amené à évoluer pour les études cliniques de phase II et III sans nécessité d'autorisation supplémentaire. Deux stratégies sont alors possibles pour la société A&M pour purifier le produit des alginates résiduels. La première consisterait à modifier le procédé de production d'Ascophyscient® en améliorant l'étape de suppression des alginates (cf. Figure 3.1) qui consiste en un traitement acide suivi d'une filtration sur plaque. Cette méthode impliquerait cependant une nouvelle validation de la reproductibilité des lots d'Ascophyscient®, déjà attestée avec le procédé existant, qui retarderait le développement clinique. La deuxième stratégie mettrait en œuvre la chromatographie d'échange d'ions pour la production de fractions de fucoïdanes débarrassées des alginates. Cette technique n'emploie aucun solvant organique, elle est simple à implanter au sein de l'entreprise avec la possibilité d'automatiser tout le processus et elle ne représente qu'un faible investissement. Bien qu'il soit difficile de produire de grandes quantités de cette fraction par chromatographie d'échange d'ions cela ne se serait pas un problème en sachant qu'une imagerie en scintigraphie ne demande que 20 µg de fucoïdane, 1g de fucoïdane produit par une seule chromatographie par échange d'ions permettrait de produire 50000 doses pharmaceutiques.

Dans le quatrième chapitre de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés aux interactions des fractions de fucoïdanes avec des biomarqueurs précédemment identifiés comme étant des cibles des fucoïdanes afin d'établir des



relations structure-activité. De nombreuses technologies permettent de mesurer l'affinité d'une molécule pour sa cible. Certaines techniques nécessitent l'emploi de fluorophores pour quantifier ces interactions. C'est le cas de la thermophorèse à micro-échelle (MST), technique basée sur l'effet Soret où les mouvements dirigés des ligands, de leurs récepteurs et des complexes qui sont soumis à un gradient de température dans des micro-capillaires, sont enregistrés. Tout changement dans la sphère d'hydratation des molécules dû à un changement dans leur structure ou conformation induit des modifications de leurs mouvements dans le gradient de température. Ces variations sont enregistrées et utilisées par la suite pour déterminer les constantes d'affinité [324]. Une autre technique utilisant la fluorescence est largement répandue, la cytométrie en flux. Cette technique purement optique permet notamment d'observer les interactions d'une biomolécule marquée en dénombrant les cellules fluorescentes, ou non, passant à travers un faisceau laser [325]. Cette technologie permet également de différencier directement tous les types cellulaires. Enfin, une troisième technique, la titration calorimétrique isotherme (ITC) permet une mesure directe et sans marquage de l'affinité et des paramètres thermodynamiques de liaison par détection de la chaleur libérée ou absorbée durant un événement entre un ligand et son récepteur [326]. Bien que cette dernière méthode présente l'avantage de ne nécessiter aucun marquage ou modification des molécules étudiées, une grande quantité de produit est nécessaire pour la détection des événements de liaison. Dans notre étude nous avons utilisé les technologies SPR et SAW. Ces techniques présentent le désavantage d'avoir à immobiliser l'un des partenaires à la surface des puces avec le risque d'altération des structures ou de limitation des mouvements nécessaires aux interactions. Cependant, la sensibilité des signaux, la possibilité d'utiliser des cellules (pour le SAW), des précédents résultats obtenus avec des fucoïdanes [184, 235] ainsi que la disponibilité des appareils dans le laboratoire ou au CEA ont orienté nos recherches sur l'utilisation de ces techniques pour déterminer l'affinité de fractions de fucoïdanes envers différents biomarqueurs.

Les difficultés techniques rencontrées avec la SPR et le SAW n'ont malheureusement pas permis d'établir les relations structure-activité escomptées. En outre, l'interaction de la fraction IEC1 avec la P-sélectine était attendue plus faible que celle observée. Cependant, cette fraction comprend dans sa composition des fucoïdanes faiblement sulfatés qui ont pu polymériser à la surface des puces. L'importance des groupements sulfates dans l'interaction avec la P-sélectine pourrait alors être sous-estimée. Par ailleurs, les alginates présents en grande quantité dans cette fraction pourraient également jouer un rôle synergique dans l'interaction de cette fraction avec la P-sélectine en apportant des ions calcium. Afin d'apporter des réponses à ces questions, d'autres tests devront être réalisés avec des alginates méthacrylés ainsi qu'avec des fractions

de fucoïdanes sous- et sur-sulfatés et des mélanges d'espèces. Dans le but de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction des fucoïdanes avec certains biomarqueurs, la SPR présente les meilleurs signaux. L'appareil utilisé pour notre étude, un Biacore X100 ne permet l'utilisation que de deux voies. D'autres appareils permettent l'utilisation de quatre voies ou plus [327]. L'emploi d'un de ces appareils permettrait de faciliter la différenciation, au moment du greffage par polymérisation électro-amorcée, de la voie de référence avec les autres voies rendant ainsi possible la détermination des paramètres cinétiques des interactions observées. Il s'agit là de problèmes techniques assez simples à résoudre dès lors que l'on dispose de l'équipement adapté.

Ces travaux ont permis en particulier de valider une méthode pour fonctionnaliser des surfaces avec des polysaccharides. La polymérisation radicalaire électro-amorcée a en effet permis de fixer covalamment des fucoïdanes modifiés chimiquement à leur extrémité réductrice à la surface de puces SPR et SAW comme en témoignent les voltamogrammes ainsi que la spectroscopie IR-ATR. Les sensorgrammes ont apporté la preuve de la présence des fucoïdanes à la surface des puces mais ont également montré que les modifications chimiques opérées sur les molécules ainsi que la polymérisation radicalaire n'ont pas eu d'impact sur la structure moléculaire des fucoïdanes. Cette méthode de polymérisation, adaptée du procédé GraftFast® développé par le CEA, a été réalisée en conditions douces dans un milieu aqueux offrant ainsi un grand champ d'application dans le domaine biomédical permettant la fonctionnalisation de nombreux supports et notamment des nanoparticules polymères [289].

# *Conclusions et perspectives*



# Conclusions et perspectives

---

L'utilisation des fucoïdanes en nanomédecine dans des traitements contre le cancer, en médecine régénérative ou dans le diagnostic de pathologies athérombotiques n'est freinée que par le manque de reproductibilité de la matière de départ. En effet, les fucoïdanes étant extraits d'algues brunes, leur composition chimique varie en fonction des paramètres écophysiologiques (temps d'ensoleillement, température de l'eau,...), empêchant ainsi toute comparaison pertinente des résultats obtenus à partir de lots différents issus d'une même algue et d'un même procédé. Dès lors, les relations structure-fonction, particulières à chaque lot, sont difficiles voire impossibles à valider, dans l'attente d'une hypothétique synthèse totale.

Dans ce contexte, nous avons considéré une approche rationnelle dans le but de développer un agent de contraste clinique utilisant des fractions de fucoïdanes (voir [3, 196, 198, 235]). À partir du travail de Varki *et al.* [91], la P-sélectine avait été confirmée comme cible moléculaire pertinente d'une fraction de fucoïdane commercial de bas poids moléculaire extraite d'*Ascophyllum nodosum* (Ascophyscient®, Algues & Mer, île d'Ouessant, France)[3]. En 2013, un laboratoire commun entre le LVTS et l'entreprise Algues & Mer fût créé suivi de mon recrutement en 2014 en tant que chef de projet pour valider le procédé de production d'une fraction de fucoïdane reproductible avec des paramètres physico-chimiques bien définis, peu importe la période de récolte de l'algue.

L'analyse physicochimique des différents lots a permis d'établir leur composition chimique (oses et sulfates en particuliers). La présence d'alginate ainsi que celle d'oligosaccharides provenant de la dégradation des extraits bruts d'algue ont été mises en évidence nécessitant l'optimisation puis la validation d'un procédé produisant des fractions de fucoïdane de grade pharmaceutique essentiellement composées de fucose sulfaté.

Un fractionnement d'Ascophyscient® par chromatographie d'échange d'ions a permis d'isoler deux fractions : IEC1 riche en alginates et IEC2 composée quasi uniquement de fucose sulfaté. Ces fractions ainsi que le composé de départ ont été modifiés chimiquement et fixés covalamment par polymérisation radicalaire électro-amorcée à la surface de puces SPR et SAW pour étudier leur affinité pour les sélectines et le VEGF. Des difficultés techniques n'ont pas permis de quantifier les constantes cinétiques des interactions et nous n'avons pas non plus observé de différences suffisamment nettes entre les sensorgrammes des différentes fractions pour identifier les espèces bioactives. En effet la fraction riche en alginates contient encore de petites quantités de fucose

sulfatées et l'on peut dès lors se demander si ces deux espèces macromoléculaires n'auraient pas une action synergique dans ce cas précis. D'autres expériences devront être réalisés afin de déterminer l'origine de cette réponse en particulier avec des fractions de fucoïdanes sous- et sur-sulfatées et à l'aide de mélanges avec des alginates.

Il est désormais possible de préparer industriellement de façon reproductible des lots de fucoïdane de bas poids moléculaire et de composition connue, étape indispensable à leur développement clinique. Ces lots ont obtenu de l'ANSM la validation « Matière Première à Usage Pharmaceutique » ouvrant ainsi la possibilité d'exploiter industriellement les nombreuses propriétés biologiques des fucoïdanes. Dans cette perspective, un agent de contraste pour l'imagerie en scintigraphie de l'athéromatose a été préparé à partir d'un lot et son étude clinique débutera en 2018 dans le cadre du projet Européen Nanoathero pour le développement d'un marqueur TEMP pour le diagnostic de l'athéromatose humaine [253].

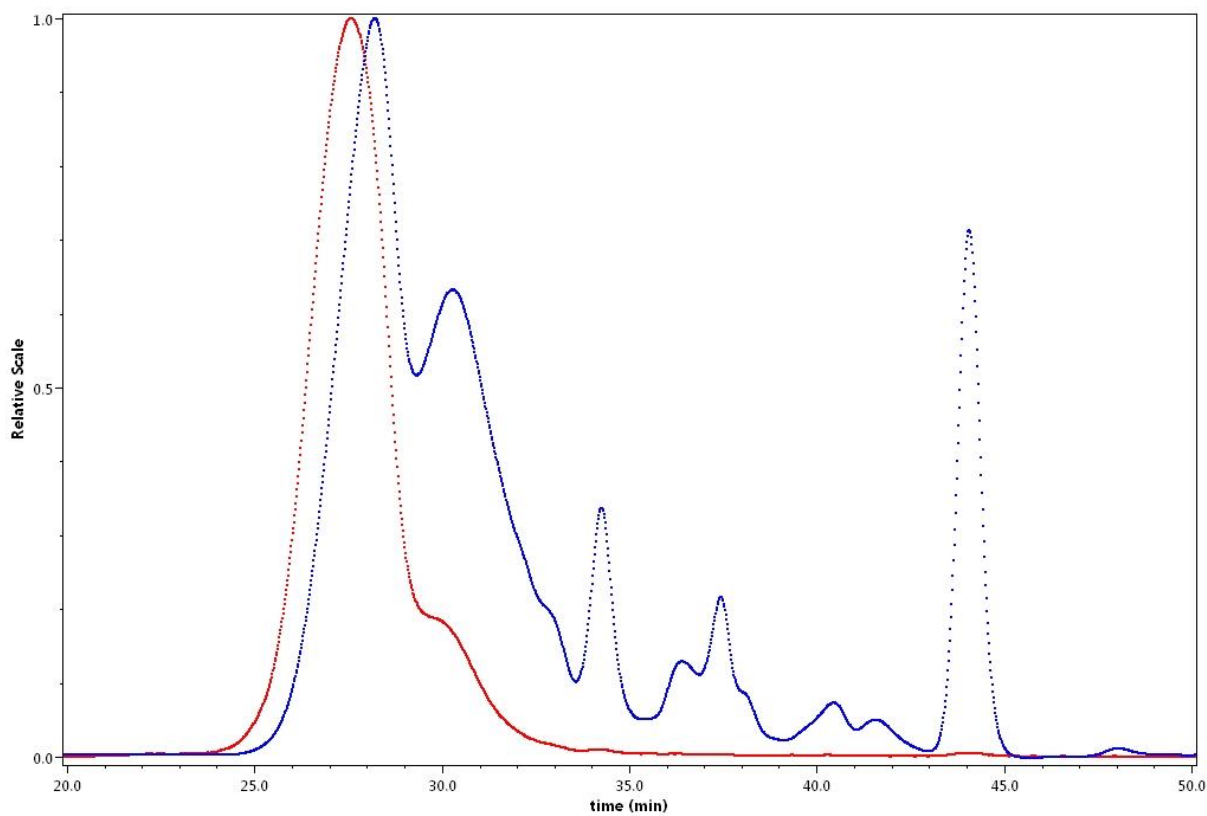
# *Annexes*





# Annexe A – Chromatogrammes HPSEC-MALLS-dRI

---



**Figure A.1** – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 1.

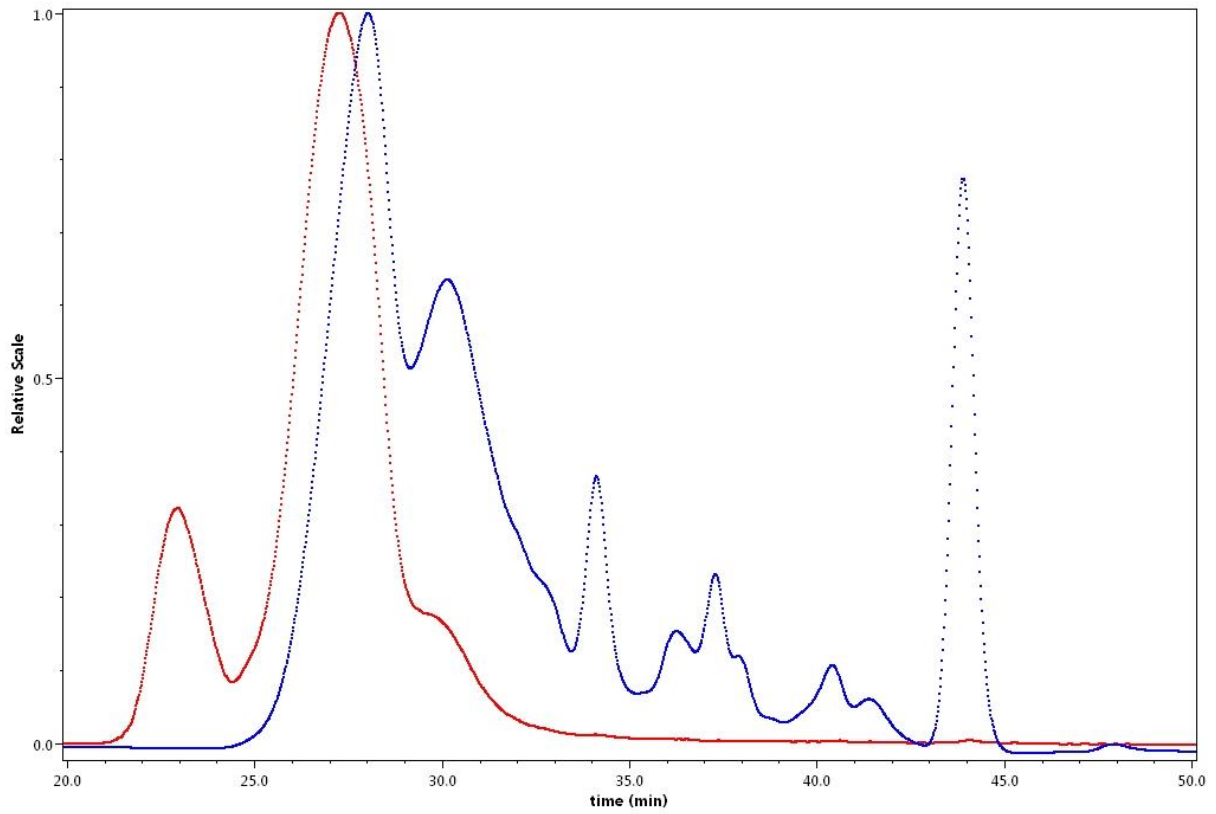


Figure A.2 – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 2.

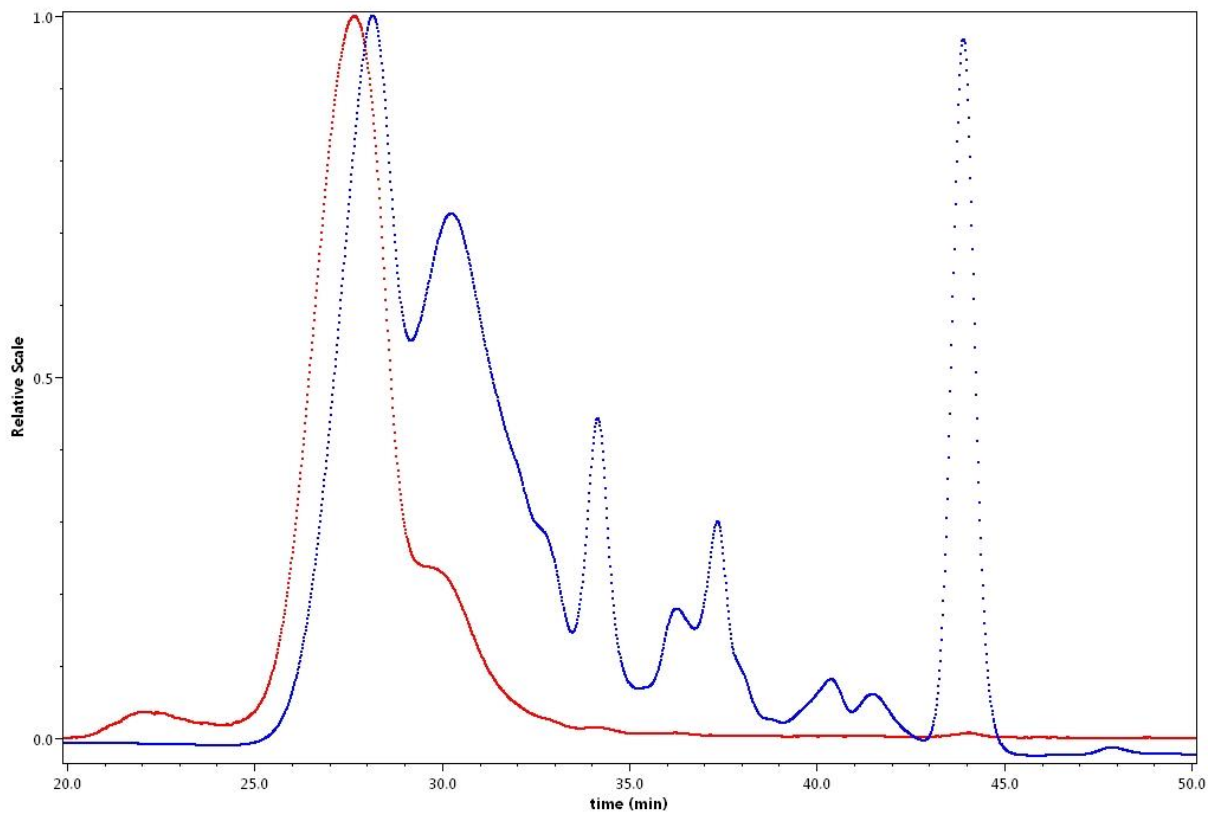


Figure A.3 – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 3.

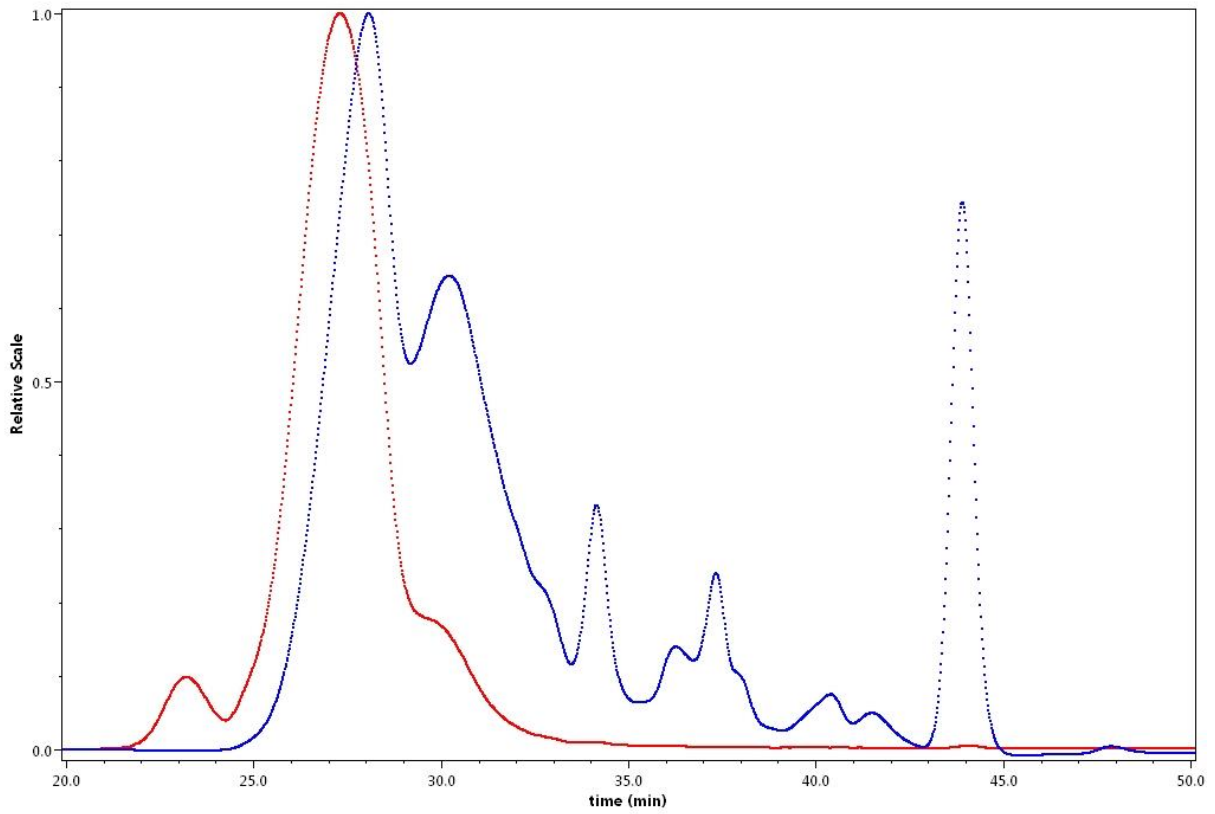


Figure A.4 – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 4.

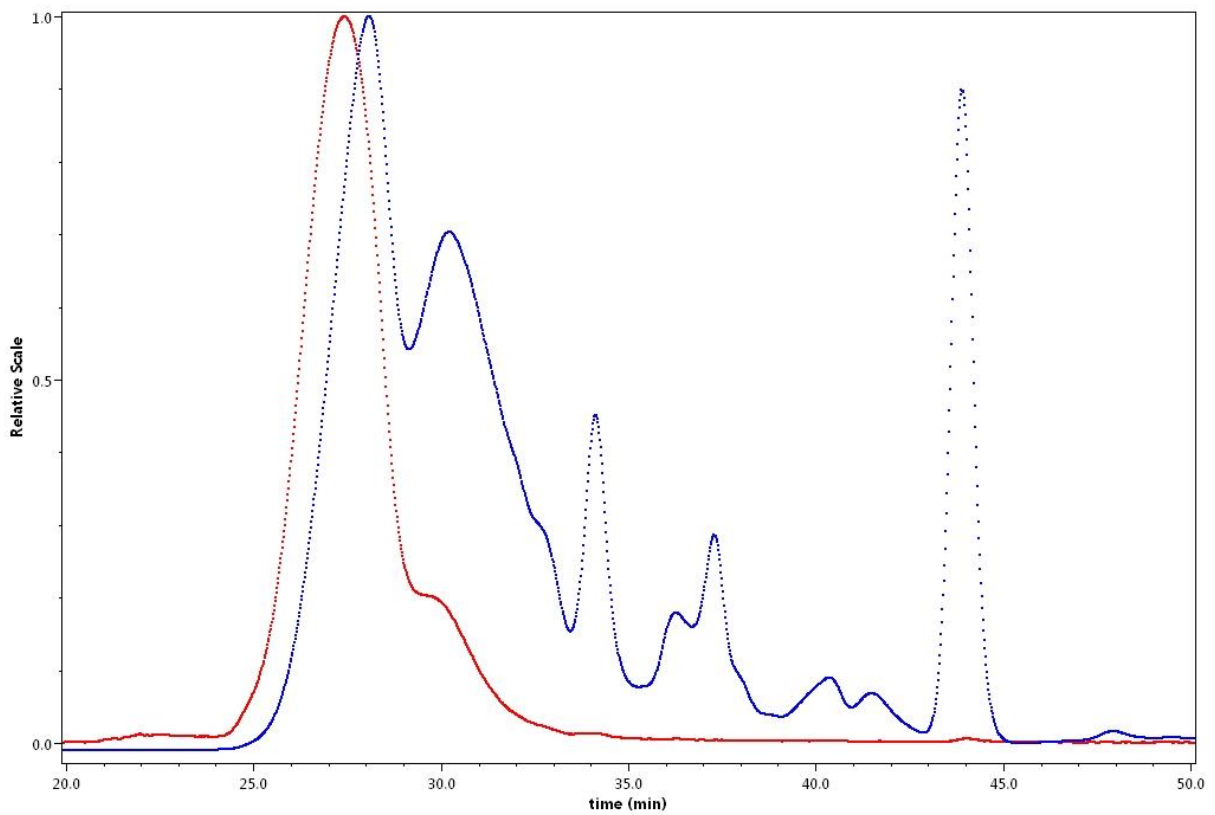


Figure A.5 – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 5.

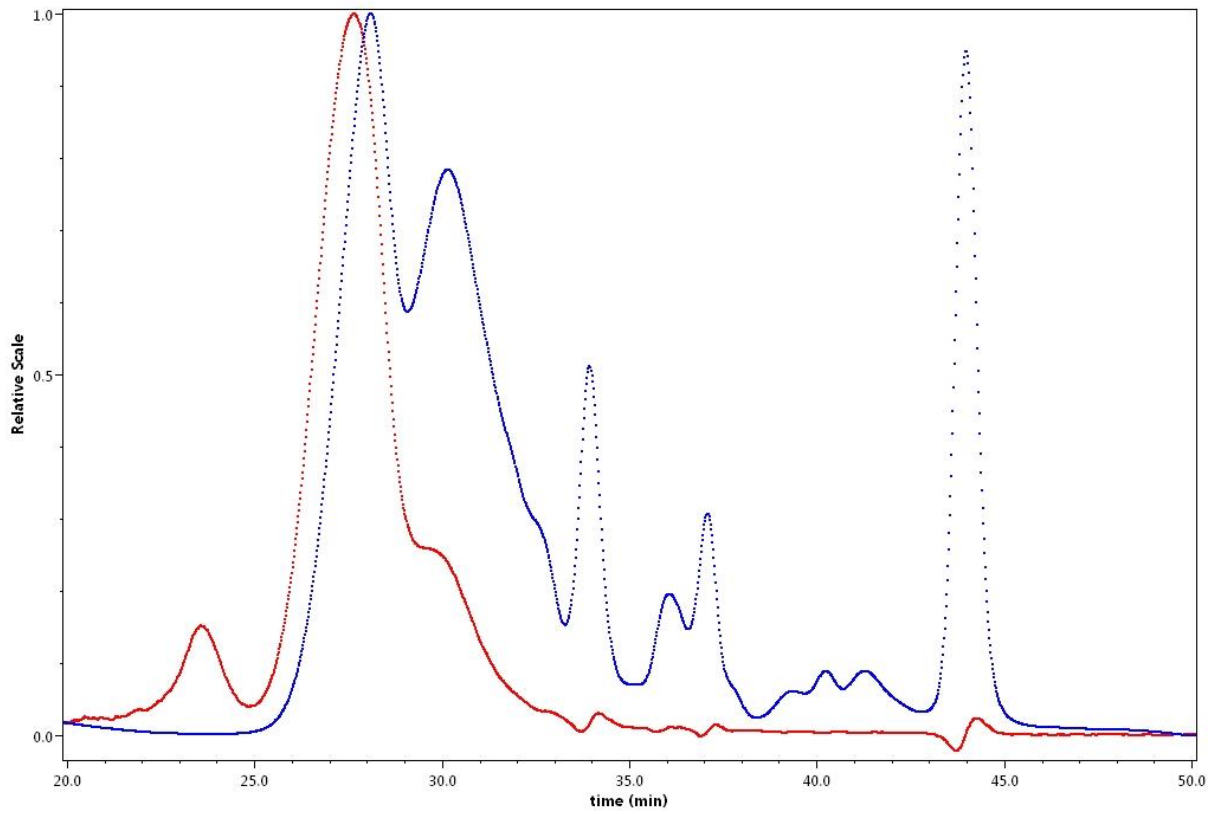


Figure A.6 – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 6.

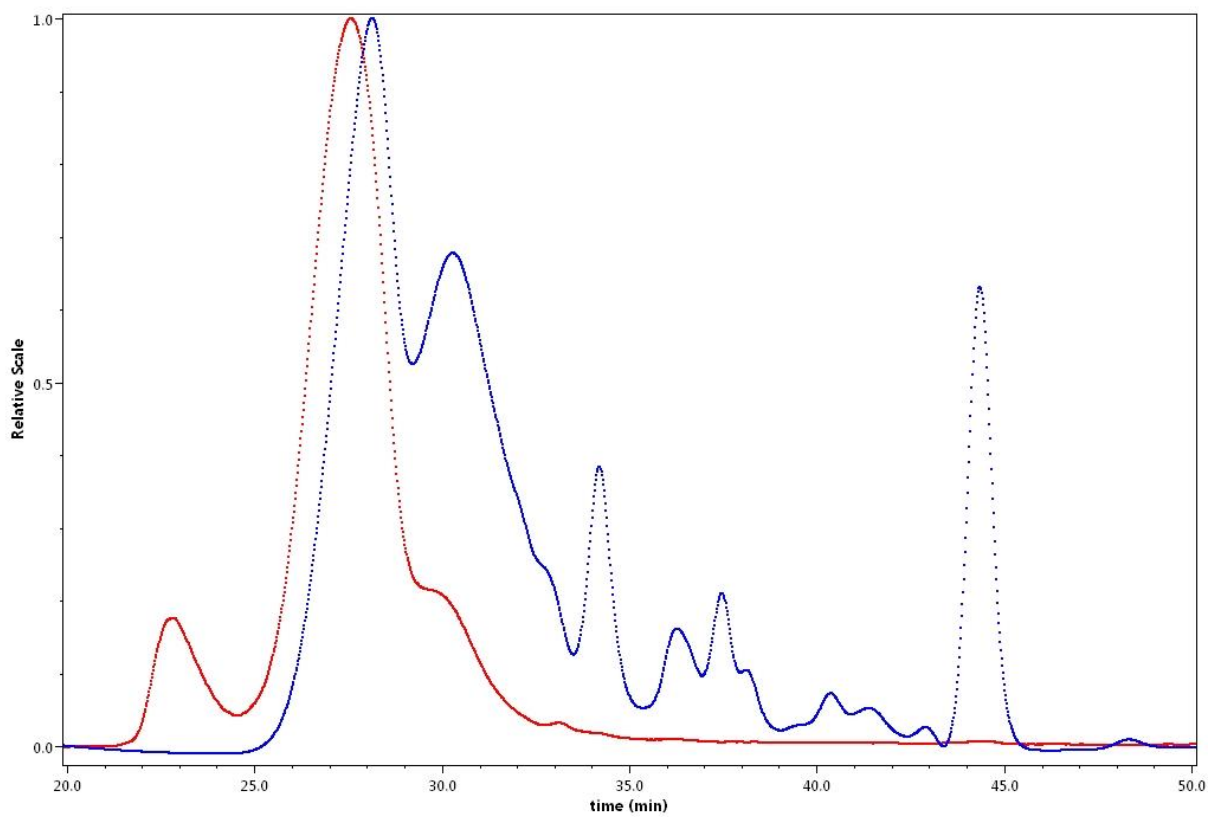


Figure A.7 – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 7.

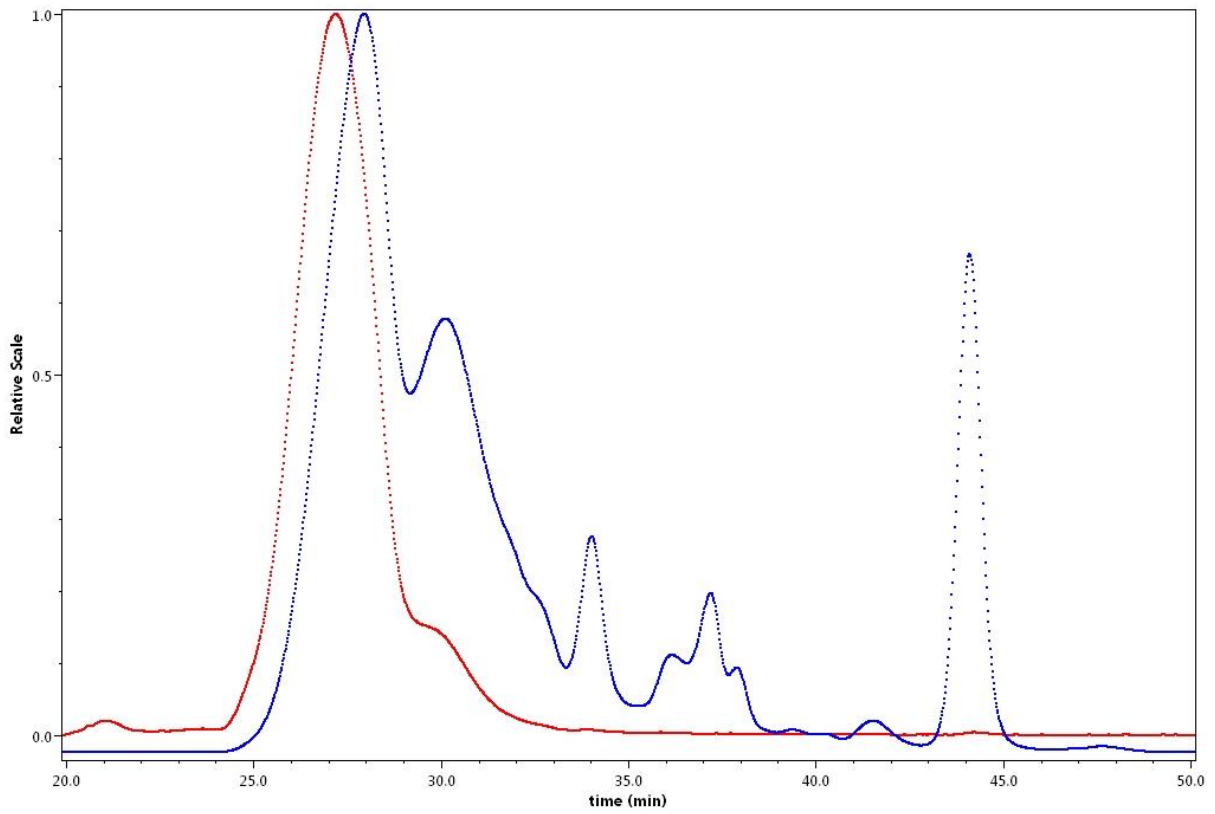


Figure A.8 – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 8.

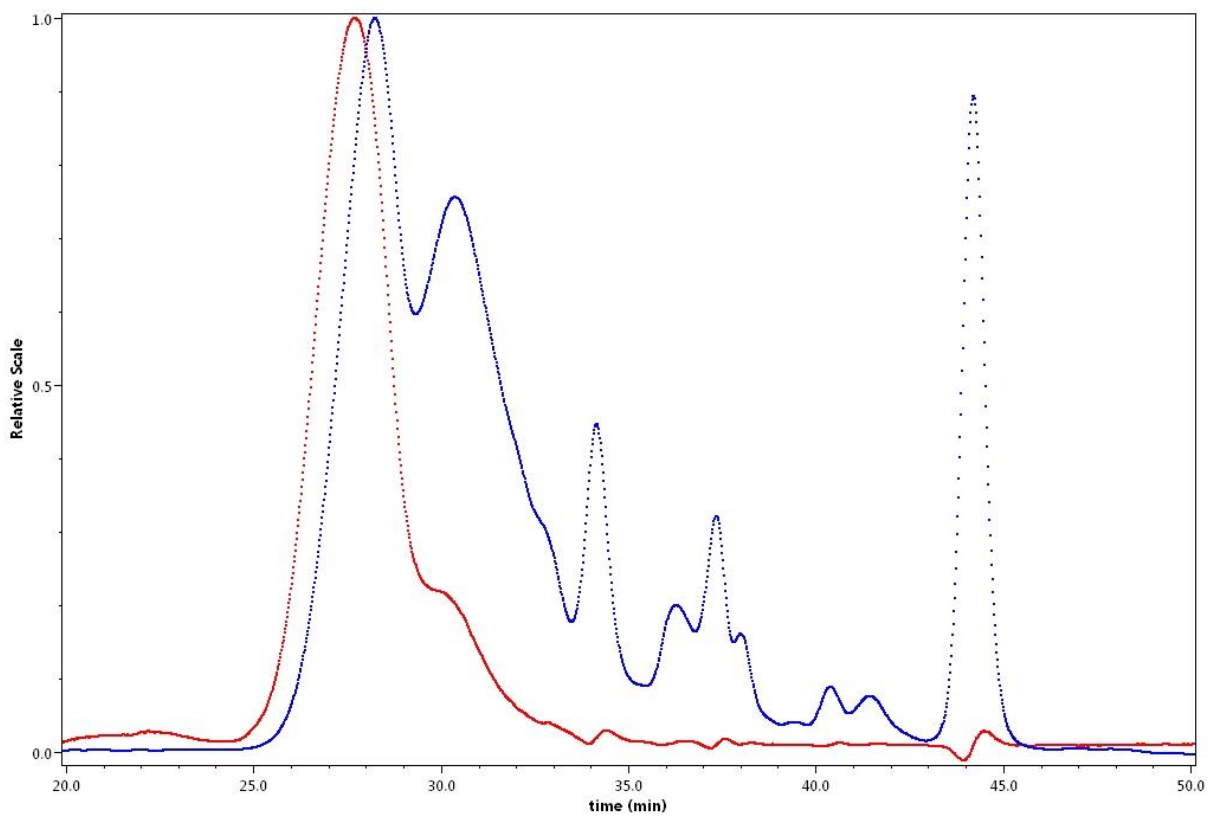
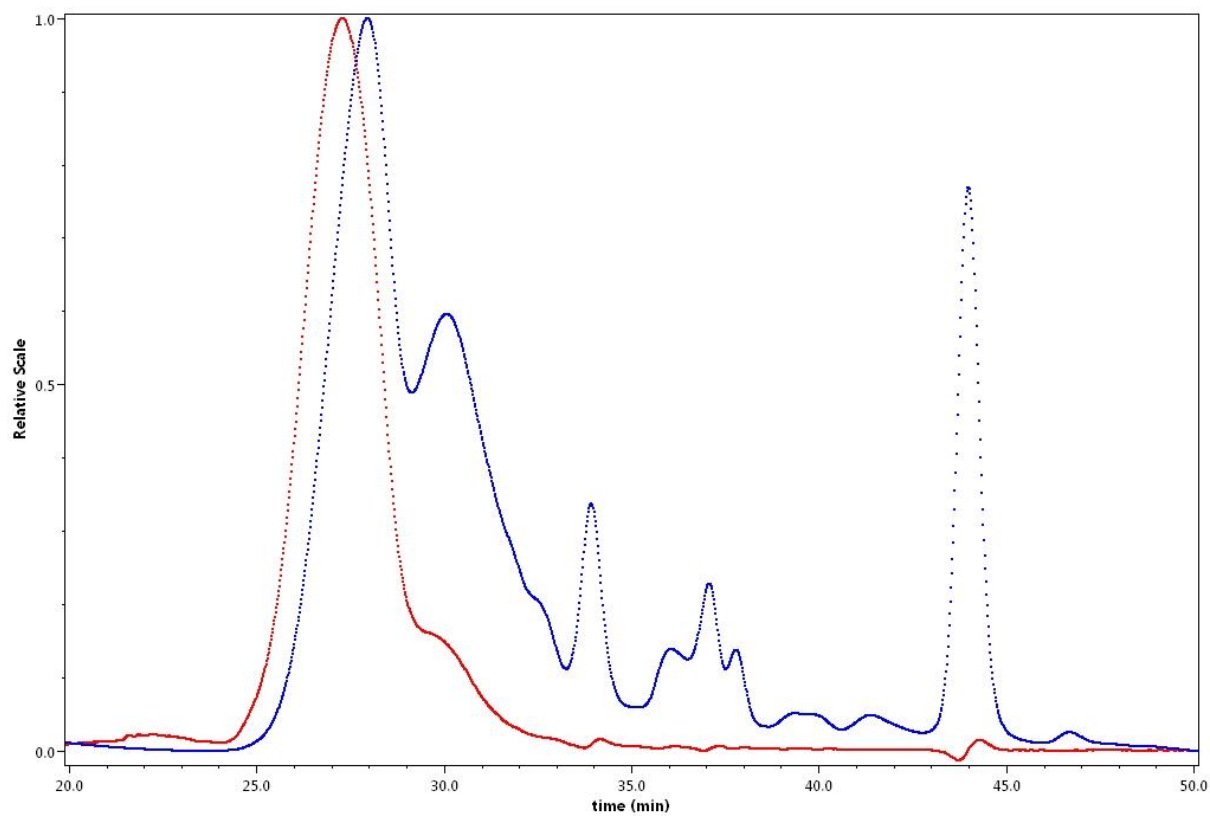


Figure A.9 – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 9.



**Figure A.10** – Chromatogramme HPSEC-MALLS-dRI du lot 10.

# Annexe B – Spectres FT-IR

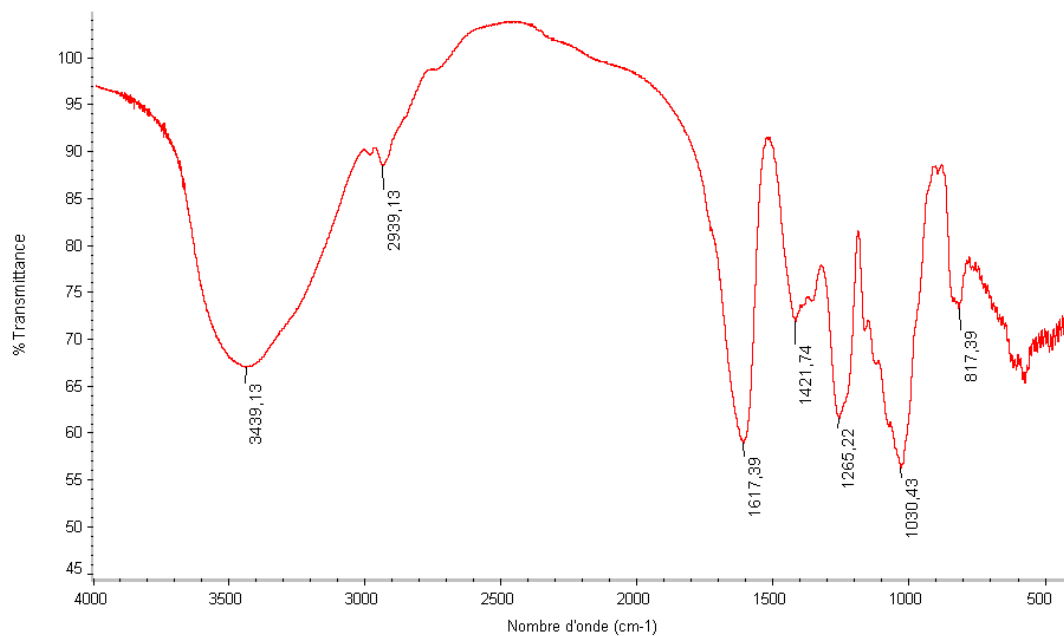


Figure B.1 – Spectre FT-IR du lot 1.

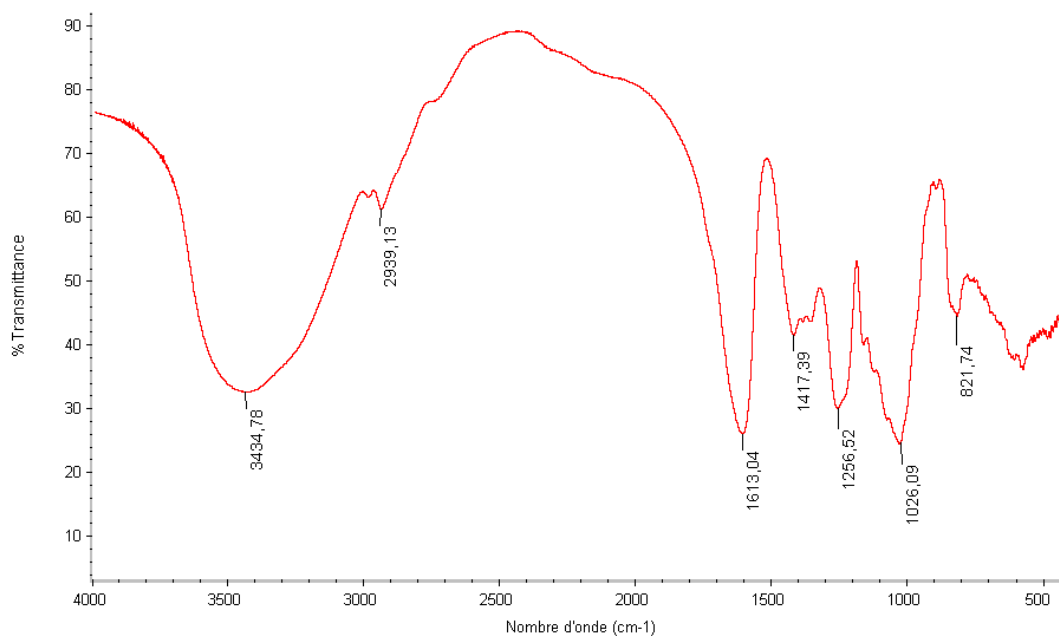


Figure B.2 – Spectre FT-IR du lot 2.

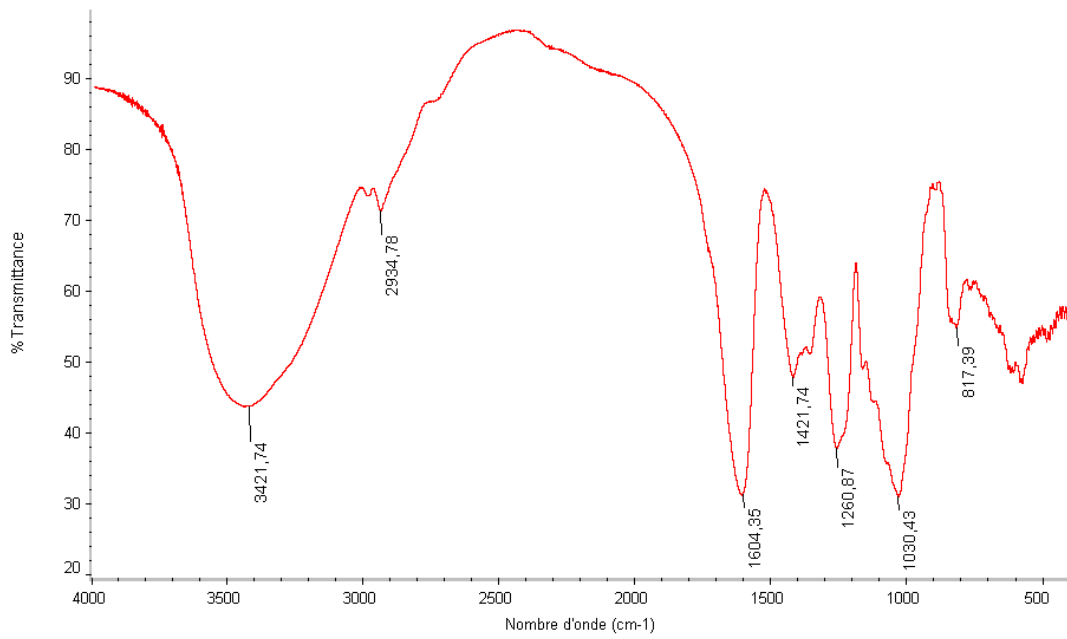


Figure B.3 – Spectre FT-IR du lot 3.

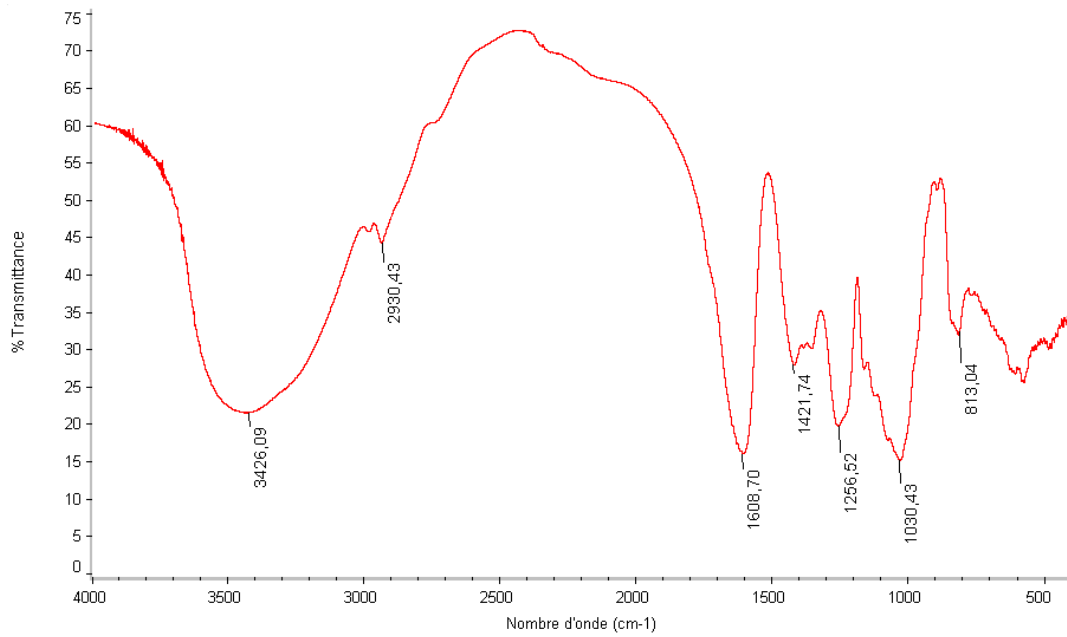


Figure B.4 – Spectre FT-IR du lot 4.



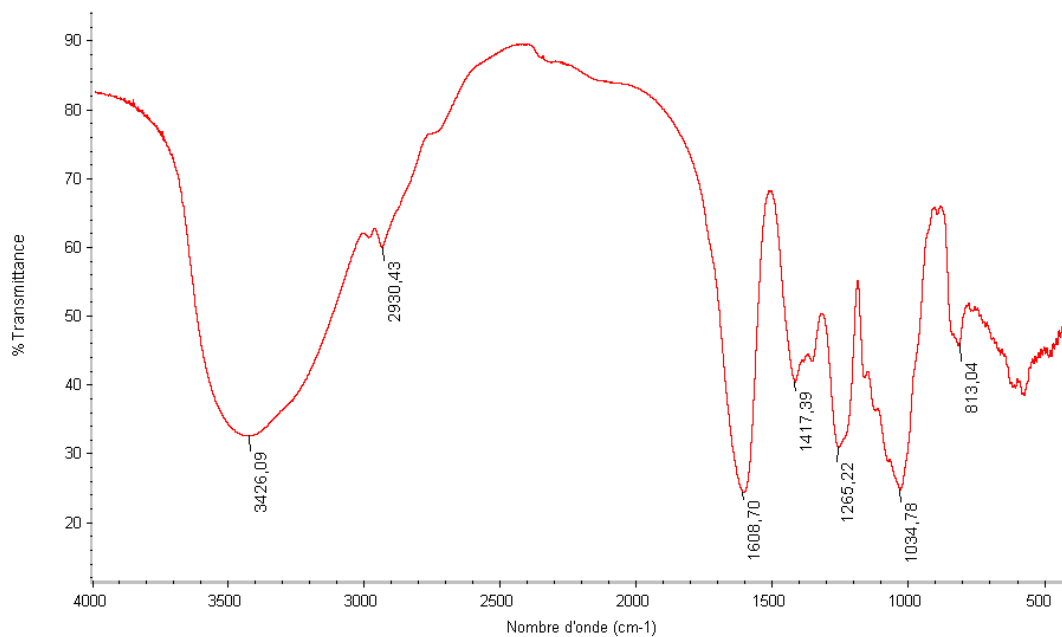


Figure B.5 – Spectre FT-IR du lot 5.

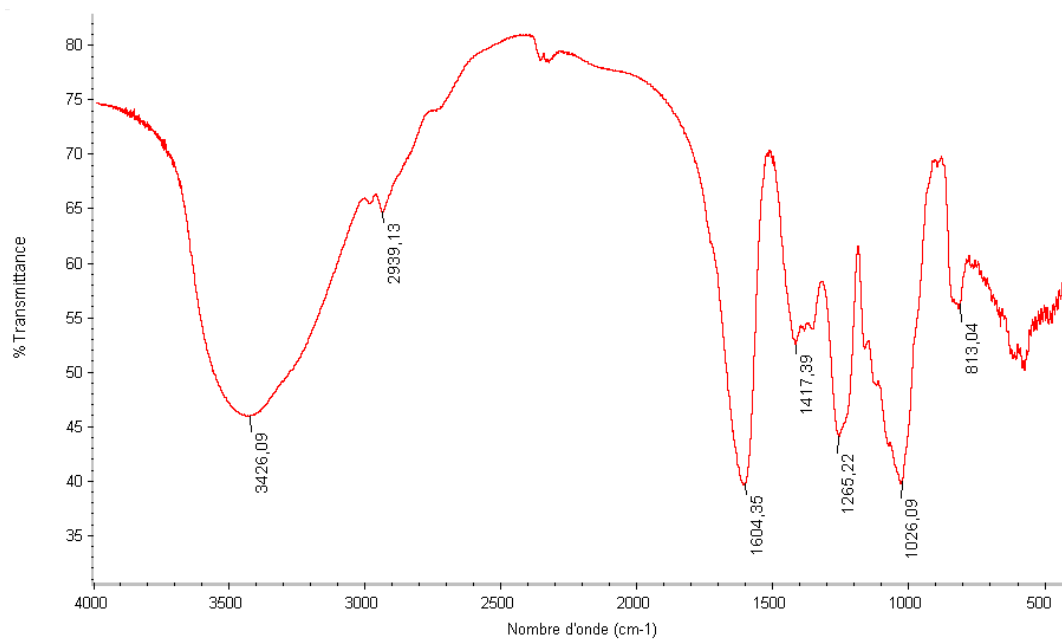


Figure B.6 – Spectre FT-IR du lot 6.

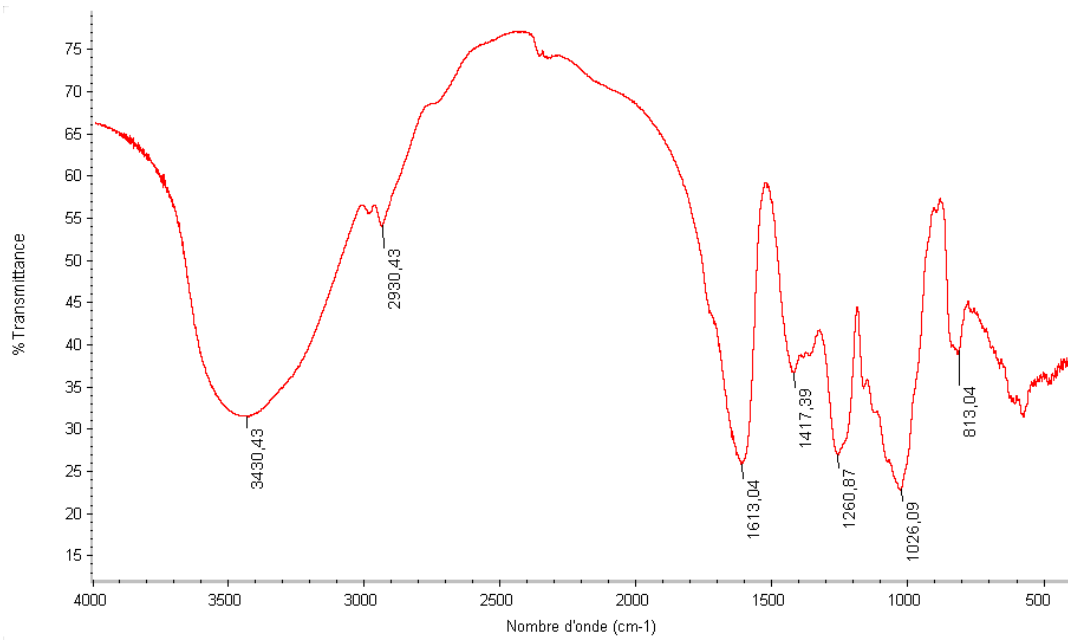


Figure B.7 – Spectre FT-IR du lot 7.

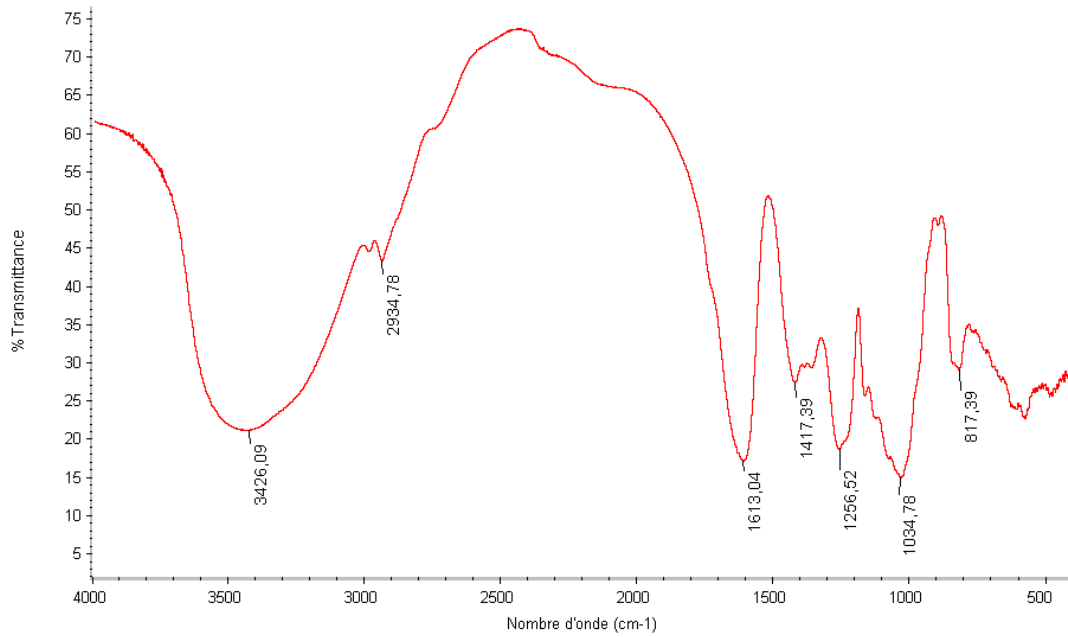


Figure B.8 – Spectre FT-IR du lot 8.

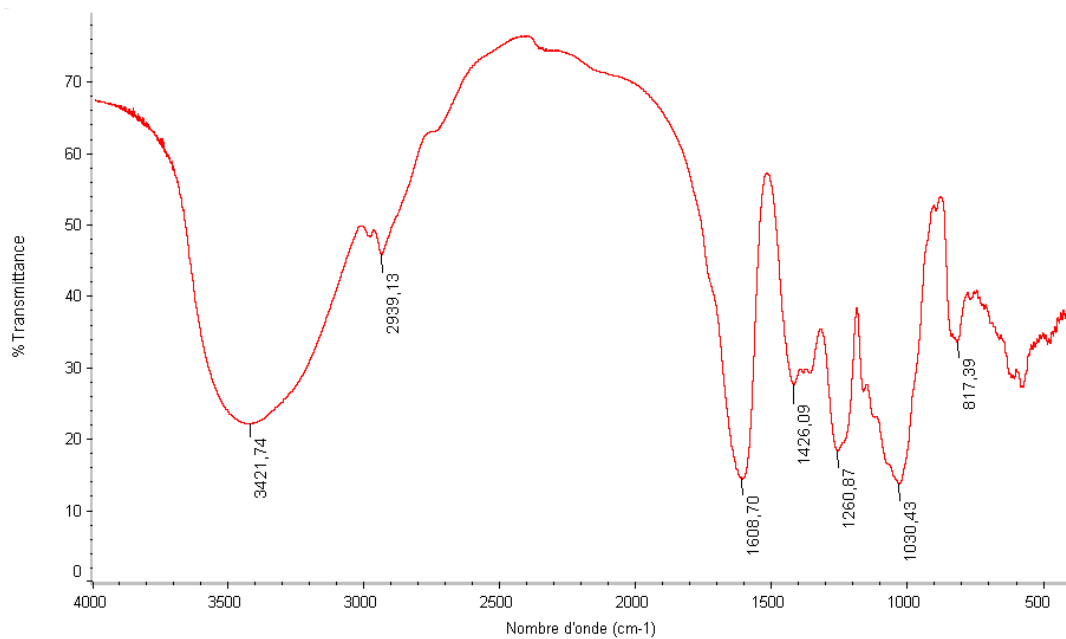


Figure B.9 – Spectre FT-IR du lot 9.

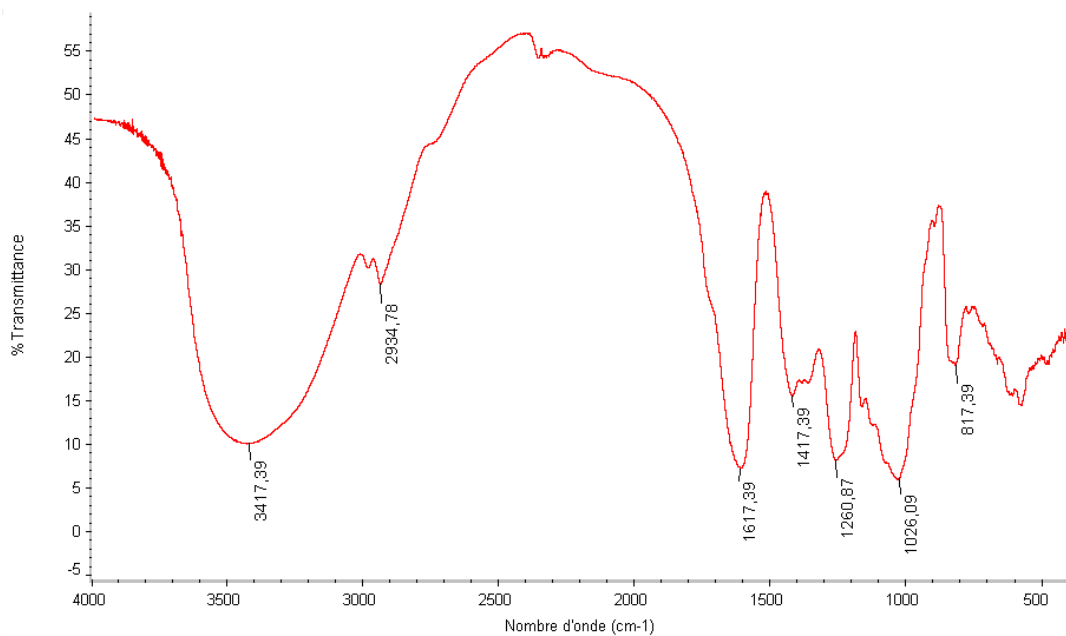


Figure B.10 – Spectre FT-IR du lot 10.



# Annexe C – Chromatogrammes dosage HPLC

---

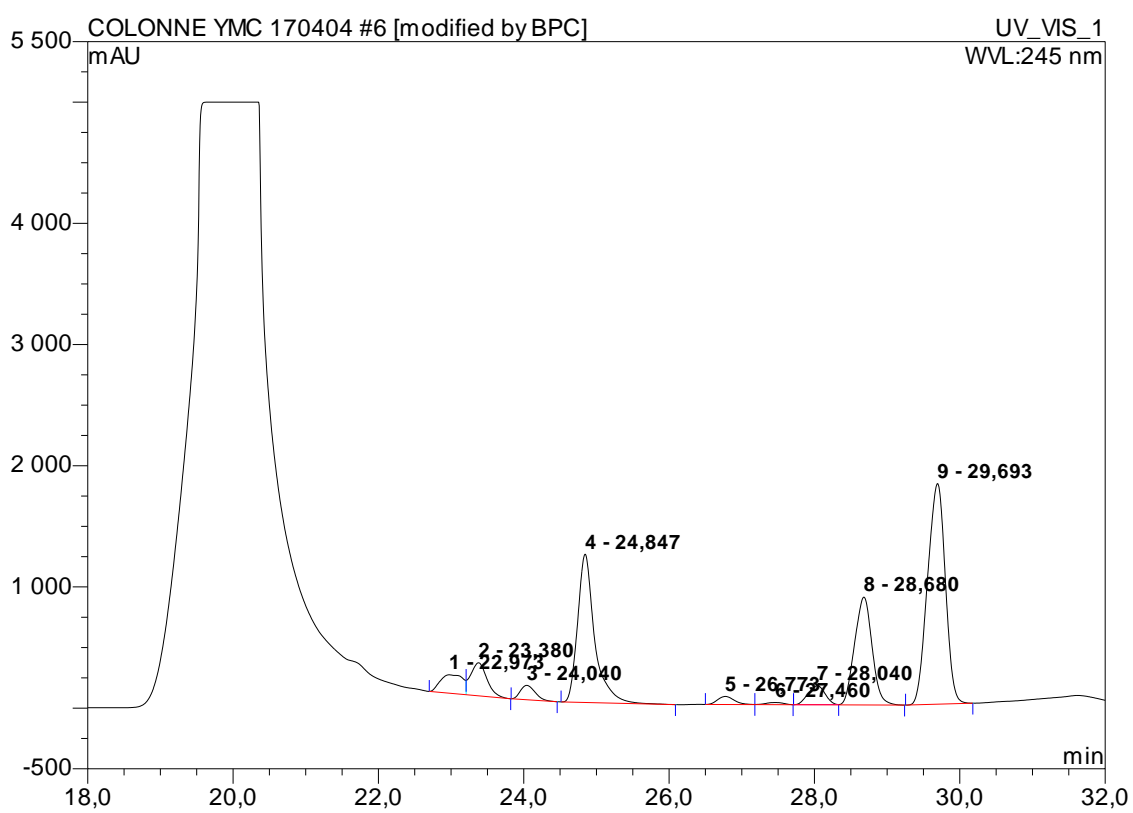


Figure C.1 – Chromatogramme HPLC du lot 1.

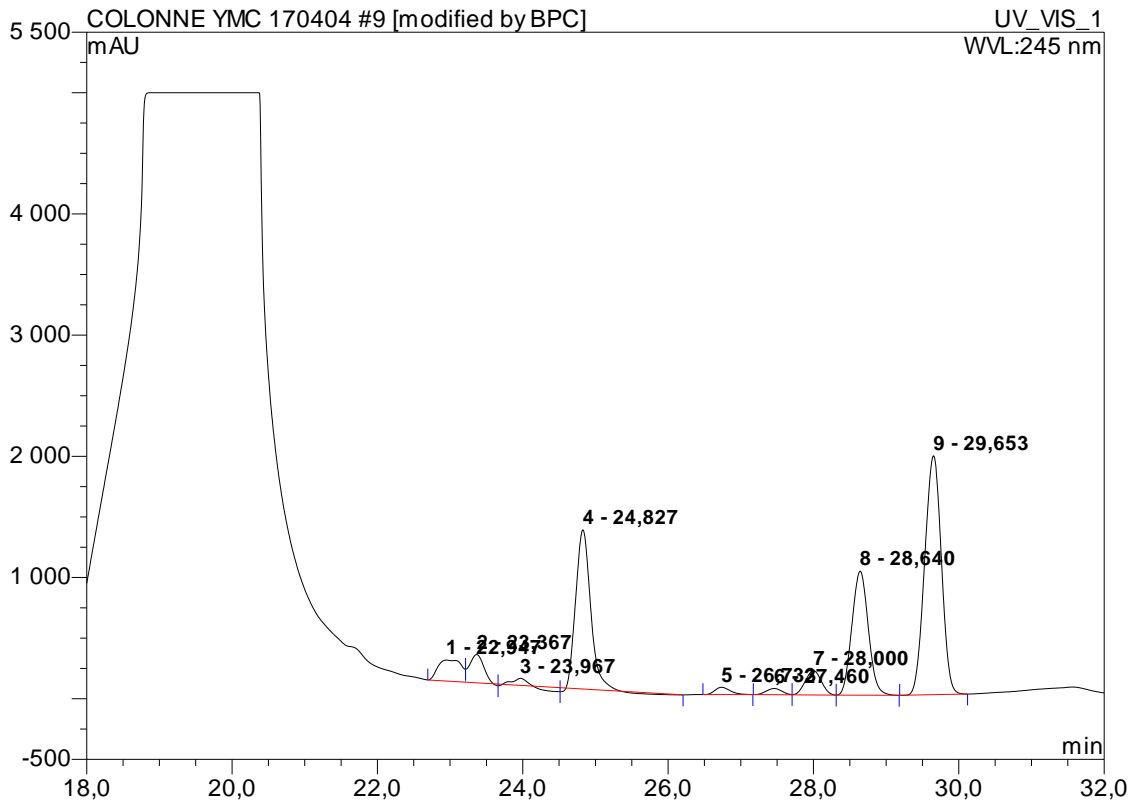


Figure C.2 – Chromatogramme HPLC du lot 2.

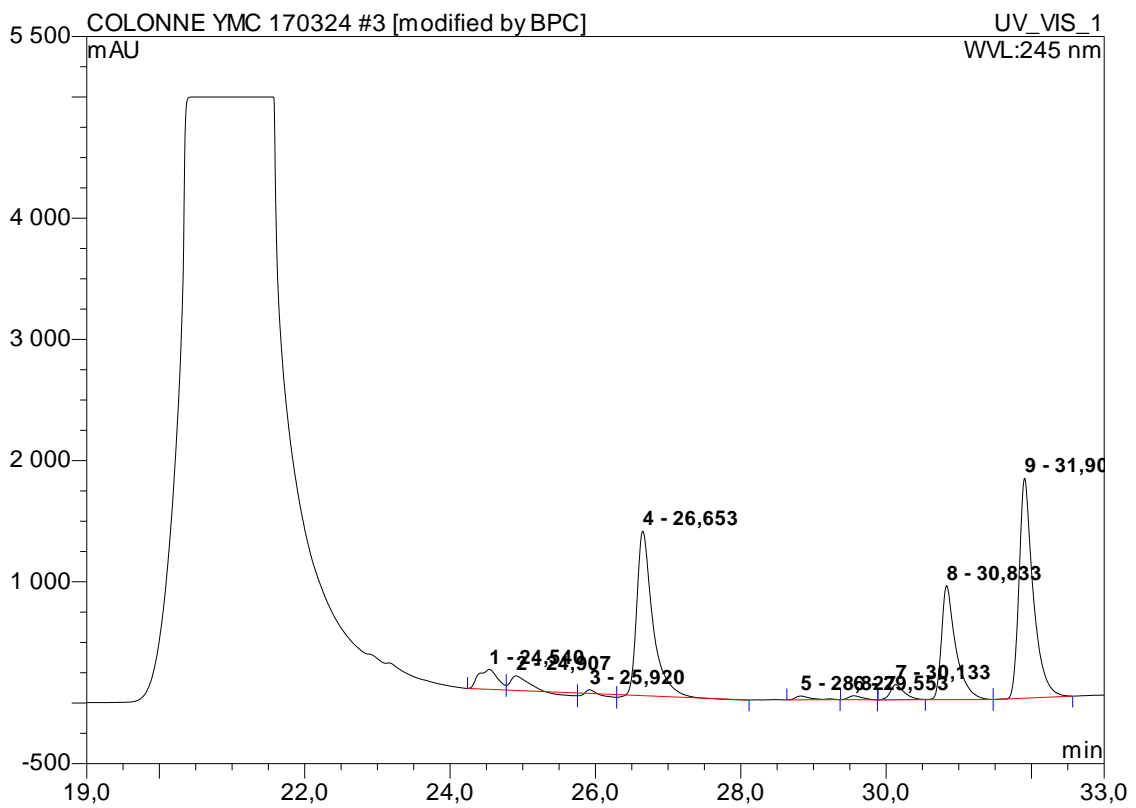


Figure C.3 – Chromatogramme HPLC du lot 3.

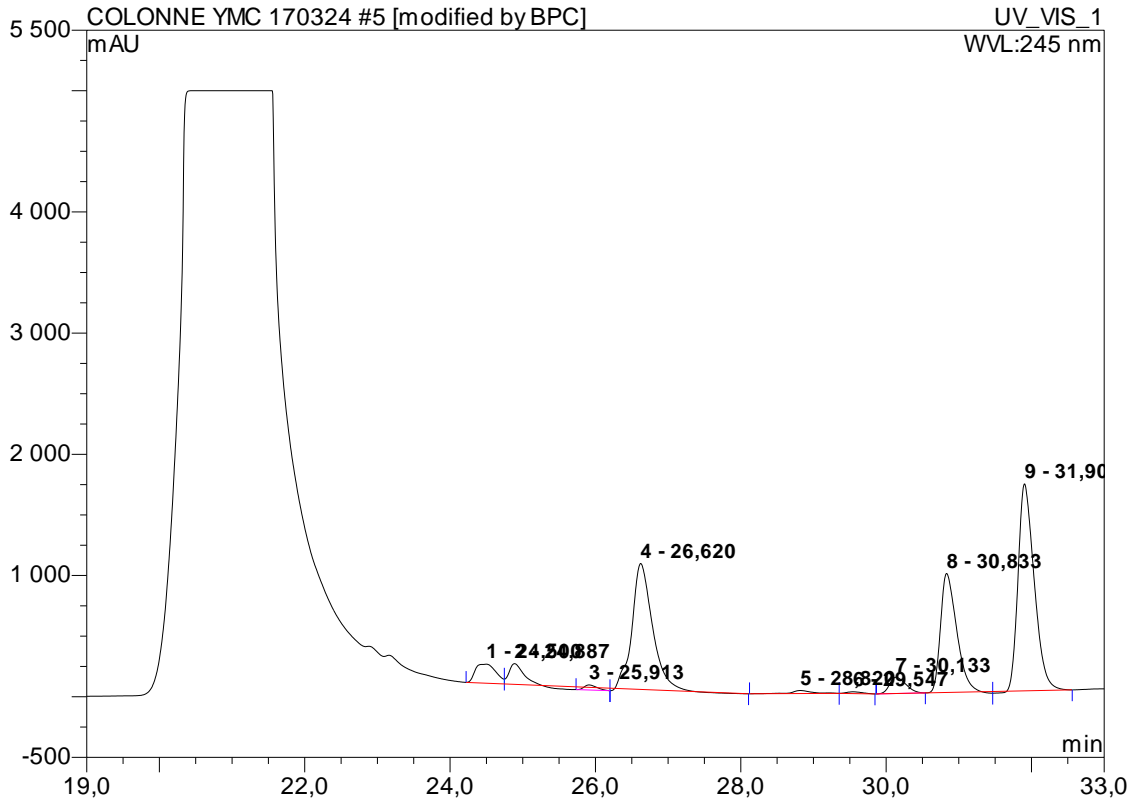


Figure C.4 – Chromatogramme HPLC du lot 4.

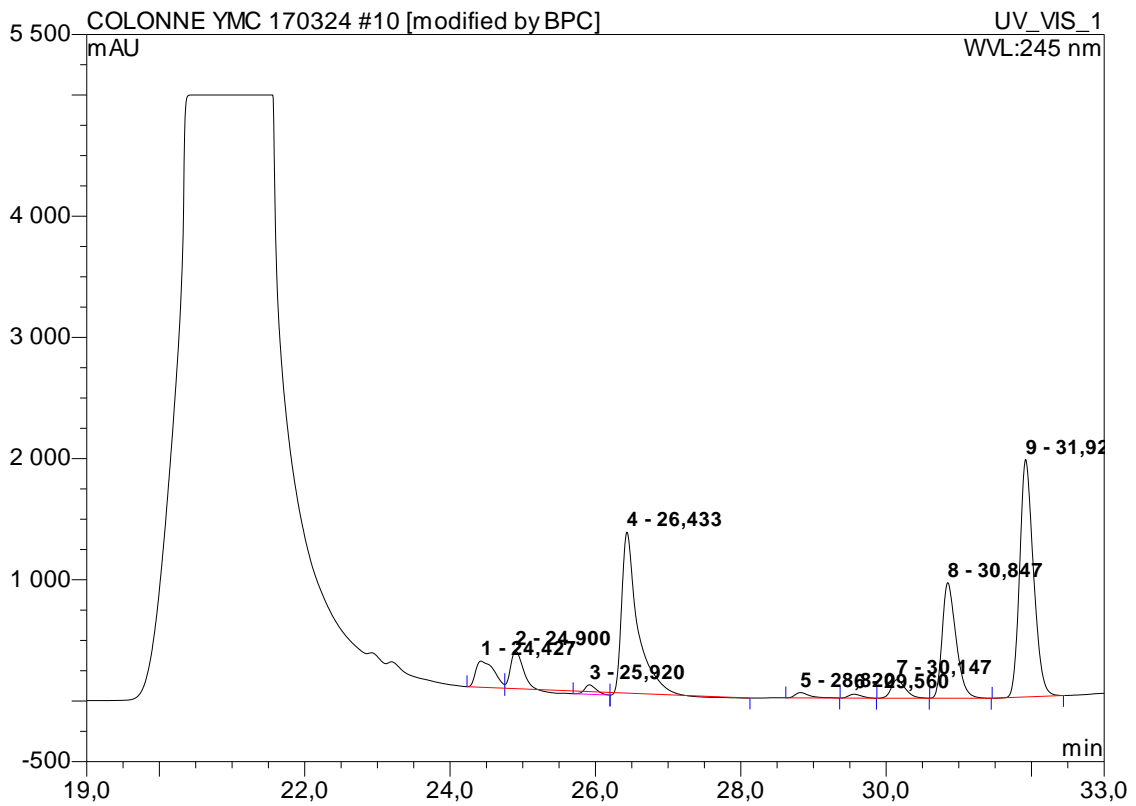


Figure C.5 – Chromatogramme HPLC du lot 5.

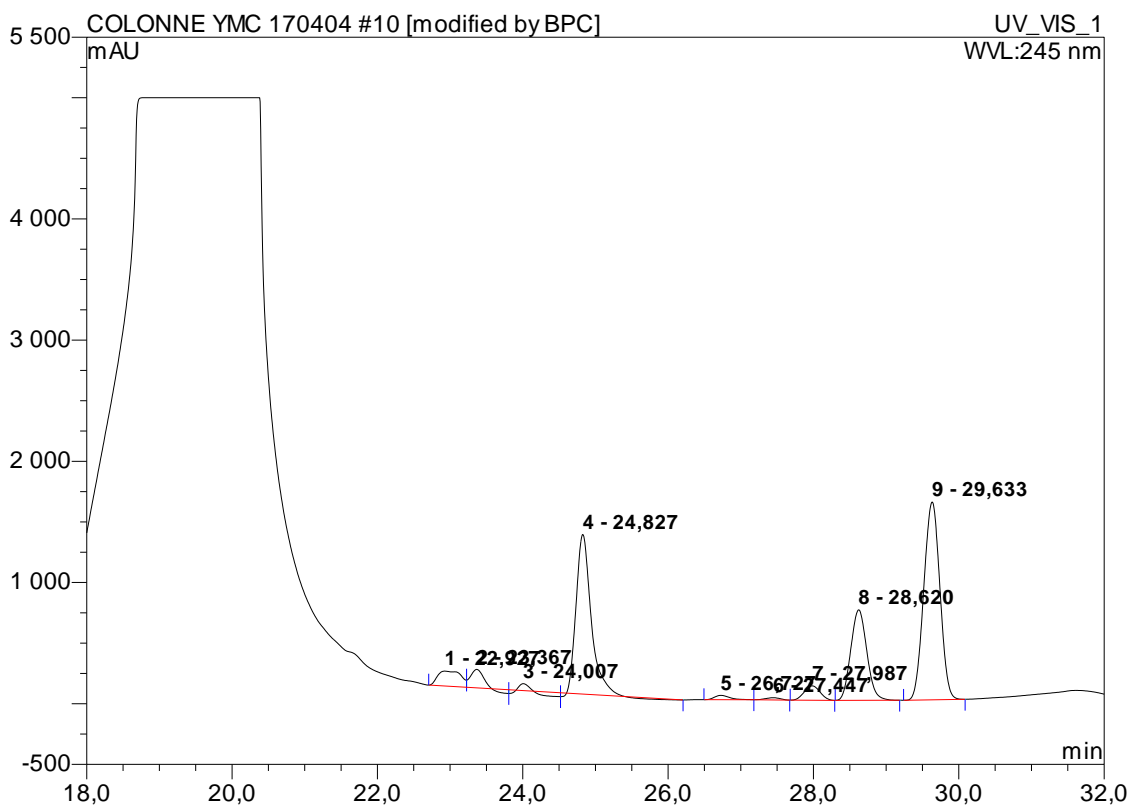


Figure C.6 – Chromatogramme HPLC du lot 6.

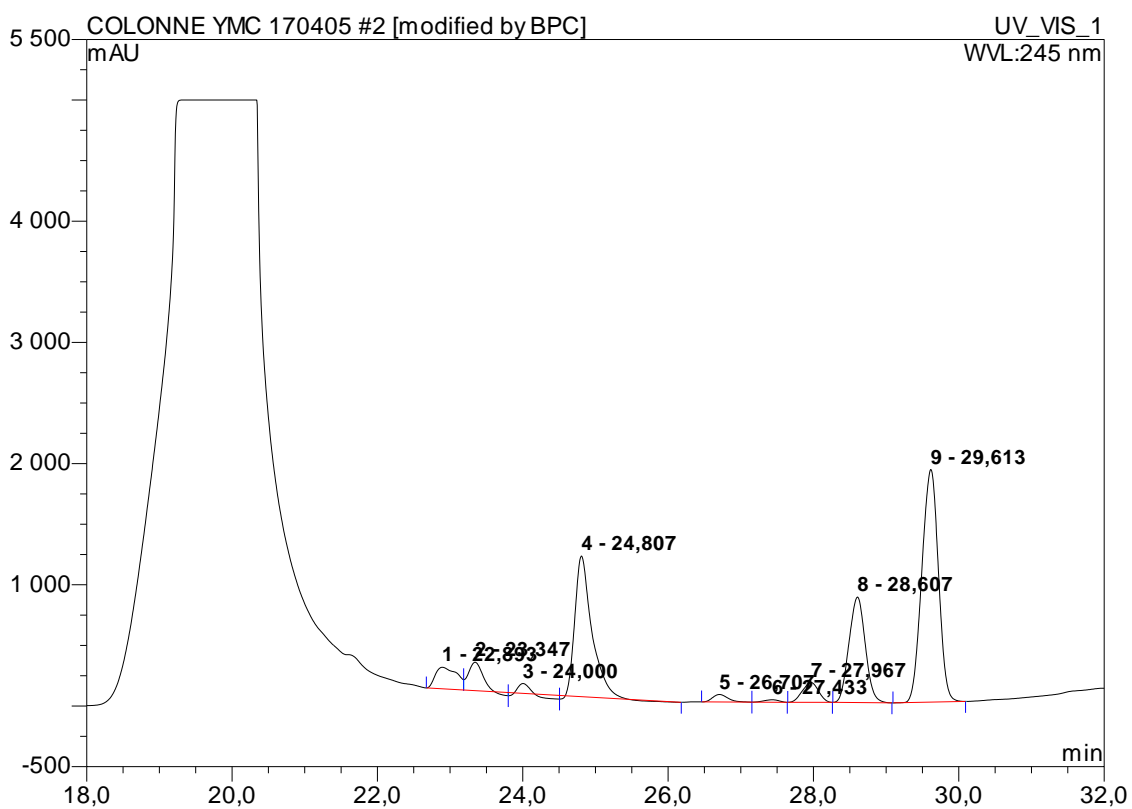


Figure C.7 – Chromatogramme HPLC du lot 7.



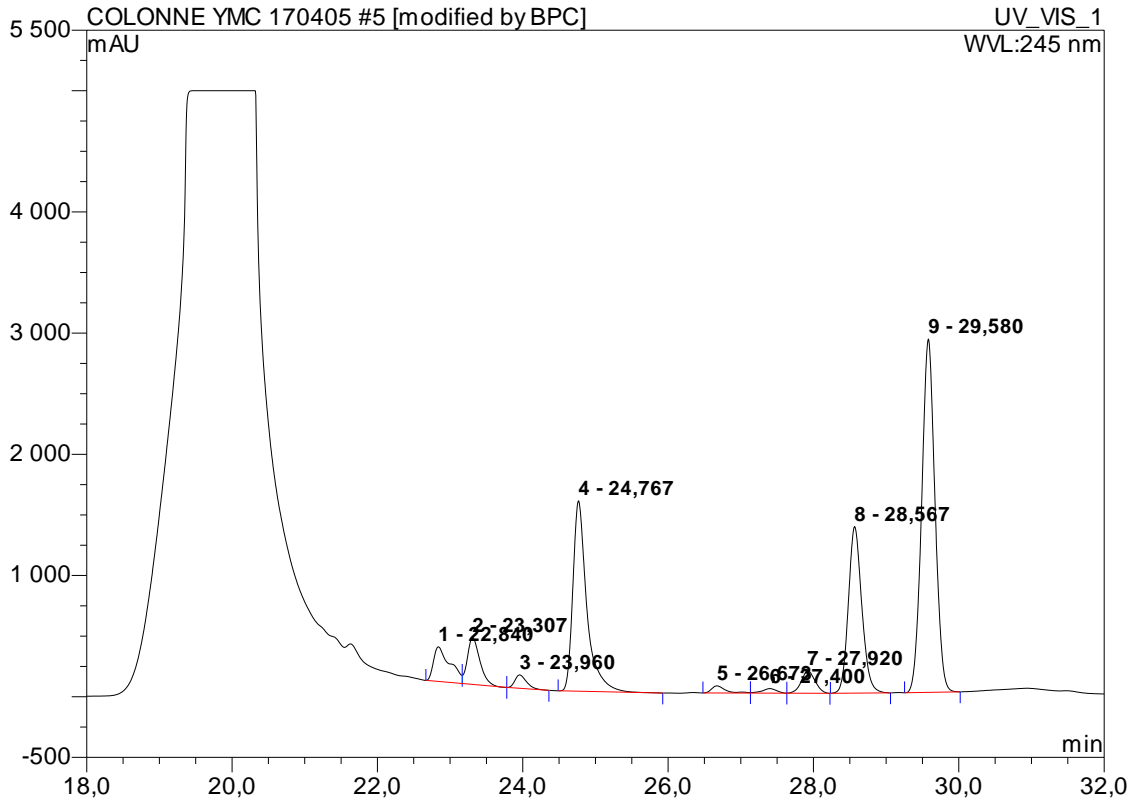


Figure C.8 – Chromatogramme HPLC du lot 8.

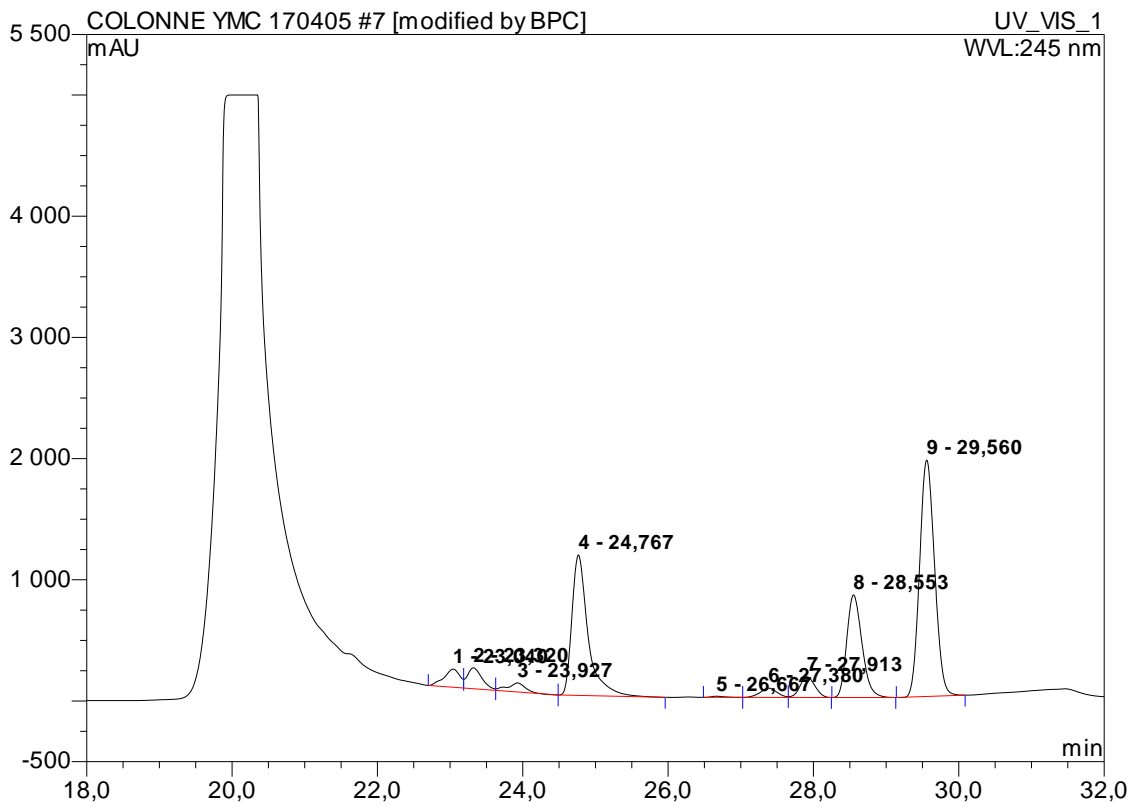


Figure C.9 – Chromatogramme HPLC du lot 9.

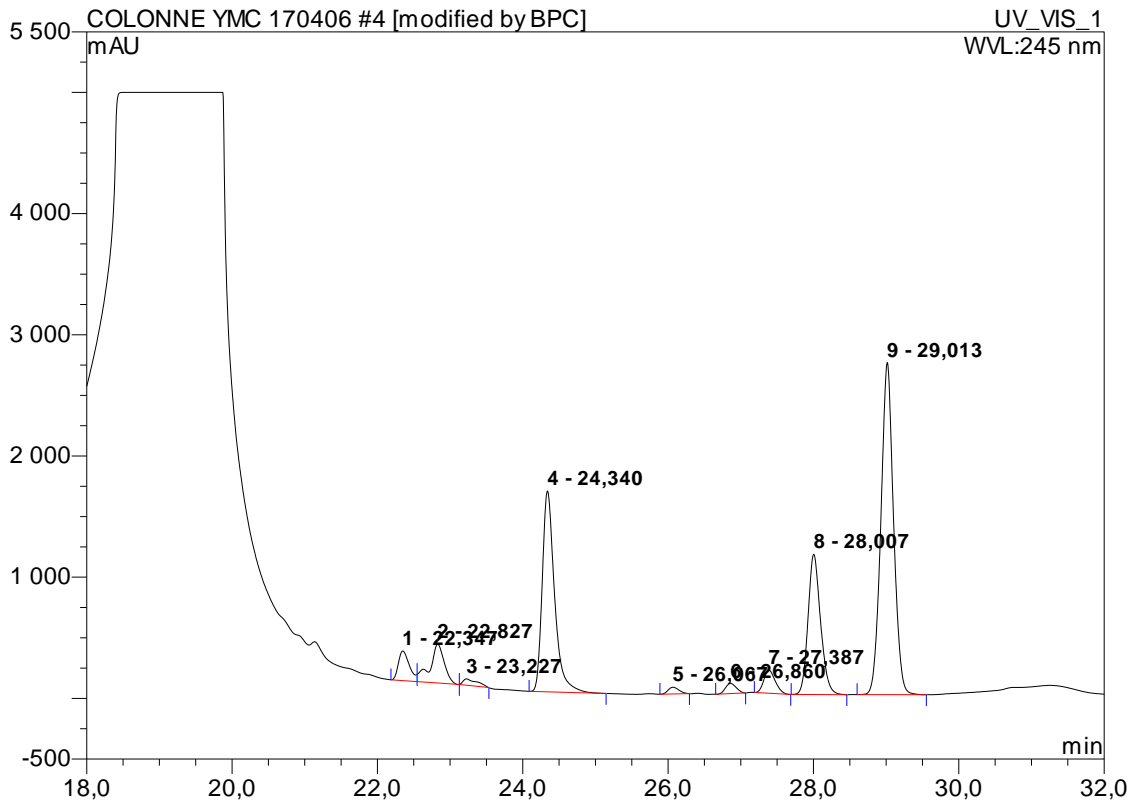


Figure C.10 – Chromatogramme HPLC du lot 10.

# Annexe D – COA des lots d'Ascophyscient®

---

*Lot 1 = ASPHY12183*

*Lot 2 = ASPHY12333*

*Lot 3 = ASPHY12399*

*Lot 4 = ASPHY13252*

*Lot 5 = ASPHY13423*

*Lot 6 = ASPHY14223*

*Lot 7 = ASPHY15201*

*Lot 8 = ASPHY15371*

*Lot 9 = ASPHY16461*

*Lot 10 = ASPHY17041*

Natural active ingredients extracted from seaweeds

## Ascophyscient® Certificate of analysis

Batch number	ASPHY12183
Production date	May 2012
Shelf life	May 2015

Ref : ASPHY

Chemical name : *Ascophyllum nodosum* Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit <sup>(1)</sup>	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	37.20
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	30.0
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	67.20

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.1 to 0.8</i>	<i>Internal method</i>	-	0.32
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	4.59
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	99

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit <sup>(1)</sup>	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.08
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.5
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517</i>	mg/kg	0.14

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	<i>Absence</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	<i>Absence</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	<i>Absence</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	<i>Absence</i>
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i> <i>NF EN ISO 16212</i>	CFU/g	< 10

(1) Mass reported to dry matter.

Ouessant, June, the 13<sup>th</sup>, 2012

Lydia Rolland, Quality Manager



Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
SIRET 398 494 674 00011 / Code NAF 2014 Z



Laboratory and production : Kernigou, 29242 Ile d'Ouessant - France / Phone : +33 2 98 48 83 40 - Fax : +33 2 98 48 84 24

Sales : 95, rue Saint-Dominique, 75007 Paris - France / Phone : +33 1 45 55 10 15 - Fax : +33 1 45 55 10 12

[information@algues-et-mer.com](mailto:information@algues-et-mer.com) - [www.algues-et-mer.com](http://www.algues-et-mer.com) - 1 / 1



Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY12333
Production date	September 2012
Shelf life	September 2015

## Ascophyscient® Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	37.28
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	18.00
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	55.28

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.1 to 0.8</i>	<i>Internal method</i>	-	0.42
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	4.09
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	100.00

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.07
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.50
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.23

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	<i>CFU/g</i>	< 10.00

Ouessant, Monday, February 11, 2013

Lydia Rolland, Quality Manager

  
 Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
 Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
 SIRET 398 494 674 00011 - Code NAF 2014 Z

(1) Mass reported to dry matter



Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY12399
Production date	October 2012
Shelf life	October 2015

## Ascophyscient® Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	45.61
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	19.80
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	65.41

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.1 to 0.8</i>	<i>Internal method</i>	-	0.36
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	2.51
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	100

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.05
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.50
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.25

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	<i>CFU/g</i>	10

Ouessant, Tuesday, October 30, 2012

Lydia Rolland, Quality Manager

  
 Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
 Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
 SIRET 398 494 674 00011 - Code NAF 2014 Z

(1) Mass reported to dry matter



Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY13253
Production date	July 2013
Shelf life	July 2016

## Ascophyscient® Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	42.47
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	17.90
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	60.37

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.1 to 0.8</i>	<i>Internal method</i>	-	0.43
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	5.36
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	100

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.05
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.5
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.14

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	<i>CFU/g</i>	< 50

Ouessant, Friday, August 30, 2013

Lydia Rolland, Quality Manager

  
 Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
 Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
 SIRET 398 494 674 00011 / Code NAF 2014 Z

(1) Mass reported to dry matter



Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY13423
Production date	November 2013
Shelf life	November 2016

Ascophyscient®

## Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	38.72
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	17.50
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	56.22

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.1 to 0.8</i>	<i>Internal method</i>	-	0.36
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	4.70
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	100.00

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.07
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.50
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.13

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	<i>CFU/g</i>	< 10

Ouessant, Wednesday, December 11, 2013

Lydia Rolland, Quality Manager



algues & mer  
Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
SIRET 398 494 674 00011 - Code NAF 2014 Z

(1) Mass reported to dry matter





Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY14223
Production date	June 2014
Shelf life	June 2017

## Ascophyscient® Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	39.58
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	17.40
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	56.98

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.1 to 0.8</i>	<i>Internal method</i>	-	0.36
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	4.64
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	99

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.07
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.50
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.11

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	<i>CFU/g</i>	< 50

Ouessant, Tuesday, July 29, 2014

Lydia Rolland, Quality Manager

  
 Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
 Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
 SIRET 398 494 674 00011 - Code NAF 2014 Z

(1) Mass reported to dry matter



Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY15201
Production date	May 2015
Shelf life	May 2018

**Ascophyscient®**

Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	38.14
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	18.70
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	56.84

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.2 to 0.6</i>	<i>Internal method</i>	-	0.47
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	4.89
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	100

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.23
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.5
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.33

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	<i>CFU/g</i>	< 50

Ouessant, Wednesday, June 10, 2015

Lydia Rolland, Quality Manager

  
 Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
 Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
 SIRET 398 494 674 00011 - Code NAF 2014 Z

(1) Mass reported to dry matter



Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY15371
Production date	September 2015
Shelf life	September 2018

## Ascophyscient® Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	38.25
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	19.80
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	58.05

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.2 to 0.6</i>	<i>Internal method</i>	-	0.36
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	5.96
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	100

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.11
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.5
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.10

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	CFU/g	< 50

Ouessant, Wednesday, October 07, 2015

Lydia Rolland, Quality Manager

  
 Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
 Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
 SIRET 398 494 674 00011 - Code NAF 2014 Z

(1) Mass reported to dry matter



Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY16461
Production date	November 2016
Shelf life	November 2019

Ascophyscient®

## Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

## ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS

	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

## ACTIVE COMPOUNDS CONTENT

	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	40.82
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	17.80
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	58.62

## PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS

	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.2 to 0.6</i>	<i>Internal method</i>	-	0.40
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	4.73
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	100

## HEAVY METALS

	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.13
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.5
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.24

## MICROBIOLOGY

	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	Absence
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	<i>CFU/g</i>	< 50

Ouessant, Wednesday, December 14, 2016

Lydia Rolland, Quality Manager

Kernigou - 29242 ILE D'OUessant - FRANCE  
Tél. +33 2 98 48 83 40 - Fax +33 2 98 48 84 24  
SIRET 398 494 674 00011 - Code NAF 2014 Z

(1) Mass reported to dry matter



Natural active ingredients extracted from seaweeds

Batch number	ASPHY17041
Production date	February 2017
Shelf life	February 2020

## Ascophyscient® Certificate of analysis

Ref.: ASPHY

Chemical name: Ascophyllum nodosum Extract

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS	Limit	Result
Aspect	<i>Fine powder</i>	Conform
Color	<i>White to ochre</i>	Conform
Smell	<i>Light and characteristic</i>	Conform
Taste	<i>Light and characteristic</i>	Conform

ACTIVE COMPOUNDS CONTENT	Limit	Method	Unit (1)	Result
Total sugars level	-	<i>Internal method</i>	%	42.42
Sulfate level	-	<i>NF EN ISO 10304</i>	%	16.66
Total sugars + sulfate level	> 30	<i>Sum of results above</i>	%	59.08

PHYSICAL / CHEMICAL CHARACTERISTICS	Limit	Method	Unit	Result
Apparent density (at 20°C) D0	<i>0.2 to 0.6</i>	<i>Internal method</i>	-	0.38
Loss on drying	< 10	<i>Eur. Ph.</i>	%	4.87
Solubility in water	<i>Soluble</i>	<i>Eur. Ph.</i>	-	Conform
Particle size < 300 µm	≥ 90	<i>Internal method</i>	%	100
Molecular weight (2)	<i>4 000 to 15 000</i>	<i>SEC</i>	Da	8100

HEAVY METALS	Limit	Method	Unit (1)	Result
Cadmium	≤ 0.5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	0.19
Lead	≤ 5	<i>NF EN ISO 11885 (ICP)</i>	mg/kg	< 0.50
Mercury	≤ 0.1	<i>Atomic fluorescence (IDHESA)</i>	mg/kg	< 0.01
Mineral arsenic	≤ 3	<i>NF EN 15517 modifié</i>	mg/kg	0.25

MICROBIOLOGY	Limit	Method	Unit	Result
<i>Candida albicans</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 18416</i>	<i>In 1 g</i>	<i>Absence</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22717</i>	<i>In 1 g</i>	<i>Absence</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 22718</i>	<i>In 1 g</i>	<i>Absence</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absence</i>	<i>NF EN ISO 21150</i>	<i>In 1 g</i>	<i>Absence</i>
Total viable mesophilic aerobic micro-organisms	≤ 100	<i>NF EN ISO 21149</i>	CFU/g	< 50

Ouessant, Monday, February 20, 2017

Lydia Rolland, Quality Manager



(1) Mass reported to dry matter



# Annexe E – Rapports d’analyses du fucoïdane à usage clinique

---

*Analyses microbiennes sur FUCO16388*

*Analyses microbiennes sur l’eau de production de FUCO16388*

*Dosage endotoxines sur FUCO16388*

*Dosage endotoxines sur l’eau de production de FUCO16388*

*Dosage formaldéhyde sur FUCO16388*

*Rapport Algaïa sur FUCO16388 + kit*



CERTIFICAT DE CONTROLE / CONTROL N°  
130960

BL N° 107187

Date de réception <i>Received</i>	03/02/17
Période d'essai <i>Period of test</i>	du 08/03/17 au 13/03/17
Identification <i>Identification</i>	Fucoïdane MP ( <i>Ascophyllum nodosum</i> )
Lot n° <i>Batch n°</i>	MP.184.AU.161007.01 - 17EX0052 - T0
Complément <i>Complement</i>	1 flacon brun + 1 pot reçu le 03/03/2017
Réf. commande <i>Purchase order</i>	SAU17-013
Technicien / <i>Scientist</i>	Emmanuelle SICARD
Date d'émission <i>Date of issue</i>	16/03/17

Adresse de livraison
<b>AMATSI - SAINT-AUGUSTIN</b>
Mme Delphine Le Tout Champ Paillard
19390 Saint-Augustin France

**CONTROLE DE LA CONTAMINATION MICROBIENNE**  
**MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NON STERILE PRODUCT**

Réf : Rapport de validation n° 1132 / 17  
Ph. Eur. éd. 9.0 (2.6.12 / 2.6.13)

Dénombrements <i>Microbial enumeration tests</i>	RESULTATS <i>RESULTS</i>	SPECIFICATIONS <i>CRITERIA</i>
	en UFC/g	
- Germes Aérobie Total (DGAT)	< 10	≤ 10 <sup>2</sup>
- Moisissures et Levures Totales (DMLT)	< 10	≤ 10 <sup>2</sup>

Recherche microorganismes spécifiés <i>Test for specified microorganisms</i>	dans 1g	
- Staphylococcus aureus	Absence	Absence
- Pseudomonas aeruginosa	Absence	Absence
- Bacillus subtilis	Absence	Absence

Aucun incident susceptible d'affecter la qualité des résultats d'essai n'a été observé.  
No event likely to affect the quality of test results was observed.

**Conclusion**

Les résultats sont conformes aux spécifications définies.  
Results comply with the specifications.

  
Amandine ROUX  
Responsable d'étude

  
Apolline MASTERNAK  
Responsable du laboratoire

Ce document comporte 1 page(s) (celle-ci comprise). / This report comprises 1 page(s).  
Ce certificat ne concerne que les objets soumis à l'essai. / This report relates to only the objects submitted for testing.  
Ce certificat ne peut pas être reproduit, sinon en entier. / This report cannot be reproduced, if not in entirety.



Headquarters:  
Parc de Génibrat  
31470 Fontenilles  
France

SAS [simplified public limited company] with capital of €8,998,000  
Register of Trade and Companies of Toulouse 423 868 181  
APE [business activity code] 7219Z  
Intracommunity VAT No.: FR 30 423 868 181





## Rapport d'essais

Date de validation : 21/09/2016 Edition n°1

Page : 1/1



N° Dossier : 16091503962501

Client : INSERM U1148 LVTS

Site de prélèvement :

Référence : 2016-3714.API - A l'attention de  
CHOLLET Lucas

Date de réception : 15/09/2016-Site de Brest

INSERM U1148 LVTS

Hôpital Bichat Claude Bernard

46 rue Henri Huchard

75018 PARIS

Point de prélèvement :

Date du prélèvement : 14/09/2016 à 15:55

Nature de l'échantillon : Eau osmosée

Traitement de l'eau : Non

Usage de l'eau : Non renseigné

Ech 1 : N.T 039828 - Eau osmosée

Date de début d'analyse : 15/09/2016

Paramètres	Méthodes	Normes	Résultat	Unités	Référence + Limite Qualité	LQ
<b>ANALYSES BACTERIOLOGIQUES</b>						
<input checked="" type="checkbox"/> Bact. Anaérobies Sulfito Réductrices (spores)	B	Filtration	NF EN 26461-2	0	ufc/100ml	4
<input type="checkbox"/> Bactéries Aérobie revivifiables à 22°C	B	Inclusion	NF EN ISO 6222 - 68h	PRESENCE	ufc/ml	4
<input checked="" type="checkbox"/> Bactéries Aérobie revivifiables à 36°C	B	Inclusion	NF EN ISO 6222 - 44h	0	ufc/ml	4
<input checked="" type="checkbox"/> Bactéries Coliformes	B	Filtration	NF EN ISO 9308-1	0	ufc/100ml	4
<input checked="" type="checkbox"/> Entérocoques intestinaux	B	Filtration	NF EN ISO 7899-2	0	ufc/100ml	4
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli	B	Filtration	NF EN ISO 9308-1	0	ufc/100ml	4
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas aeruginosa	B	Filtration	NF EN ISO 16266	0	ufc/100ml	4
<input type="checkbox"/> Staphylocoques pathogènes	B	Filtration	XP T90 412	0	ufc/100ml	4
<b>ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES</b>						
<input checked="" type="checkbox"/> Carbone Organique Total	Q	Oxyd. chimique/IR	NF EN 1484	<0,5	mg/l C	< 2(R)

Référence et limites de qualité issues: Code de la santé publique

Copie à :

Validation scientifique par :

LE ROCH EMMANUELLE Technicien microbiologiste  
DALBIES AUDE Responsable Technique

Validation administrative par :

Jacques DUSSAUZE Chef de service Polluant

B : Analyse réalisée sur le site de Brest Accréditation n°1-1827 Q : Analyse réalisée sur le site de Quimper Accréditation n°1-1828 P : Analyse réalisée sur le site de Ploufragan Accréditation n°1-5676

Résultats précédés du signe < correspondant aux limites de quantification (LQ). Pour déclarer conforme, ou non, il n'a pas été tenu compte de l'incertitude associée aux résultats (ec) = en cours d'analyse - NA = non analysé - NI = non interprétable - \* = nombre estimé - PRESENCE = 1 à 3 colonies - PNQ = présence non quantifiable en raison d'une flore interférente

La reproduction de ce rapport d'essai n'est autorisée que sous sa forme intégrale. Seules certaines prestations rapportées dans ce document sont couvertes par l'accréditation. Elles sont identifiées par le symbole miniaturisé

Ce rapport annule et remplace tout rapport partiel émis précédemment.

Pour déclarer ou non la conformité, il n'a pas été tenu compte de l'incertitude associée aux résultats (incertitudes communiquées sur demande). La déclaration de conformité est couverte par l'accréditation si tous les paramètres sont couverts par l'accréditation.

Laboratoire agréé par les ministères chargés de l'Agriculture, de la santé et de l'environnement (voir site internet de ces ministères)

Laboratoire agréé pour la réalisation des prélèvements et des analyses terrains et/ou des analyses des paramètres du contrôle sanitaire des eaux - portée détaillée de l'agrément disponible sur demande

ANA-EO.MRE.8.BQ version 4



G.I.P LABOCEA  
7 rue du sabot - CS 30054 - Zoopole - 22440 PLOUFRAGAN - Tél : 02 96 01 37 22 - Fax 02 96 01 37 50  
22, avenue Plage des Gueux - CS 13031 - 29334 QUIMPER CEDEX- Tél : 02 98 10 28 88 - Fax 02 98 10 28 60  
120, avenue Alexis de Rochon BP 52 - CS 10052 - 29280 PLOUZANE - Tél : 02 98 34 11 00 - Fax : 02 98 34 11 01  
contact@labocea.fr - site internet : labocea.fr

Politique de reproduction disponible dans l'onglet « EU Specific Documents » de notre portail web sur :  
[http://www.criver.com/customer-service/resources/portal-logins\\_section\\_Endosafe\\_Customer\\_Web\\_Portal](http://www.criver.com/customer-service/resources/portal-logins_section_Endosafe_Customer_Web_Portal).

pour le client n° : /

Edité par :  
**Charles River**  
**Endotoxin and Microbial Detection**  
Tél. : +33 (0)4 37 50 25 46  
Email : Endosafe.labEU@crl.com

**Algues et Mer**  
A l'attention de Lydia Rolland  
Kernigou  
29 242 OUESSANT

## ESSAI DES ENDOTOXINES BACTERIENNES

Revue Contrat Technique

**Questionnaire technique  
Selon 115-047**

Technique

**Méthode D  
Colorimétrie cinétique**

Sensibilité

**0,005 UI/mL**

Date de réception

**07 octobre 2016**

Date de l'analyse

**10 octobre 2016**

Nbre d'échantillons

**1**

Produit

**FUCO**

Limite en endotoxines (Algues et mer)

**6,25 UI/µg**

*Les essais ont été réalisés en accord avec la Pharmacopée Européenne en vigueur, chapitre "2.6.14 – Endotoxines Bactériennes" harmonisé en collaboration avec les Pharmacopées Américaine et Japonaise.*

ID produit  
**FUCO**

Conditions opératoires

Sauf indication contraire, l'échantillon est testé au 1/10 d'une solution à 10 000 µg/mL.  
Analyse réalisée avec du tampon « Endotoxin Specific »

Lot / Prélèvement / Numéro

**FUCO16388**

Concentration en endotoxines    Unités

**7,9 x 10<sup>-5</sup> UI/µg !**

Note : les résultats ne valent que pour le (les) objet(s) soumis à l'essai.  
D'autre part, le(s) résultat(s) ne tiennent pas compte de l'incertitude de mesure de l'essai.

**cofrac**



**ESSAIS**

ACCREDITATION

N° 1-5805

Portée disponible

sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Opérateur  
Fanny DE PIN  
Tech. de laboratoire

11 OCT. 2016

Approbateur Qualité

Non applicable cGMP

Approbateur Technique

Gilles GOY  
Responsable des Laboratoires EMD

11 OCT. 2016

**microbial solutions**

9 allée Moulin Berger - 69130 Ecully - France

Tel : 00 33 437 50 25 30 • Fax : 00 33 437 50 25 34 • [www.criver.com](http://www.criver.com)

Charles River Endotoxin Microbial Detection Europe S.A.S. • Capital : 24 440 903 € • VAT No. FR 54 790 161 723 • SIREN : 790 161 723 • APE 4669C

Politique de reproduction disponible dans l'onglet « EU Specific Documents » de notre portail web sur :  
[http://www.criver.com/customer-service/resources/portal-logins\\_section/Endosafe\\_Customer\\_Web\\_Portal/](http://www.criver.com/customer-service/resources/portal-logins_section/Endosafe_Customer_Web_Portal/).

pour le client n° : /

Edité par :  
**Charles River**  
**Endotoxin and Microbial Detection**  
Tél. : +33 (0)4 37 50 25 46  
Email : Endosafe.labEU@cr1.com

**Algues et Mer**  
A l'attention de Lydia Rolland  
Kernigou  
29 242 OUESSANT

## ESSAI DES ENDOTOXINES BACTERIENNES

Revue Contrat Technique

Questionnaire  
technique

Technique

Méthode D  
Colorimétrie cinétique

Sensibilité

0,005 UI/mL

Date de réception

19 Septembre 2016

Date de l'analyse

22 Septembre 2016

Nbre d'échantillons

1


  
**ESSAIS**  
 ACCREDITATION  
 N° 1-5805  
 Portée disponible  
 sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Opérateur  
Sara HULLY  
Tech. de laboratoire

27 SEP. 2016



Produit  
**Eau osmosée**

Limite en endotoxines (Algues et mer)

0,25 UI/mL

*Les essais ont été réalisés en accord avec la Pharmacopée Européenne en vigueur, chapitre "2.6.14 – Endotoxines Bactériennes" harmonisé en collaboration avec les Pharmacopées Américaine et Japonaise.*

ID produit  
**Eau osmosée OS01**

Conditions opératoires  
Sauf indication contraire, les échantillons sont testés purs.

Lot / Prélèvement / Numéro

Prélèvement du 15/09/2016

Concentration en endotoxines Unités

&lt;0,005 UI/mL

Note : les résultats ne valent que pour le (les) objet(s) soumis à l'essai.  
D'autre part, le(s) résultat(s) ne tiennent pas compte de l'incertitude de mesure de l'essai.

Approbateur Qualité

Non applicable cGMP

Approbateur Technique

Gilles GOY  
Responsable des Laboratoires EMD

27 SEP. 2016

microbial solutions

9 allée Moulin Berger - 69130 Ecully - France

Tel : 00 33 437 50 25 30 • Fax : 00 33 437 50 25 34 • [www.criver.com](http://www.criver.com)

Charles River Endotoxin Microbial Detection Europe S.A.S. • Capital : 24 440 903 € • VAT No. FR 54 790 161 723 • SIREN : 790 161 723 • APE 4669C

amatsiavogadro



Parc de Génibrat  
31470 FONTENILLES – France

ANALYTICAL REPORT V2

<b>Product: FUCOIDANE</b>	
<b>Batch: MP.184.AU.161007.01</b>	<b>Sponsor: AMATSI ST AUGUSTIN</b>
<b>Analysis Number: A1702CQ268</b>	
<b>Reference method: Adaptation of Ph. Eur. 9<sup>th</sup> edition § 2.4.24 "Identification and control of residual solvents" (01/2017:20424)</b>	

TEST	SPECIFICATIONS	RESULT
Residual solvent: formaldehyde	Report	Estimation: 171 ppm

Comments: /

<p><b>Project Leader</b> <b>Audrey ROQUES</b> (Date and signature):</p> <p>23 MAR 2017 </p>	<p><b>Quality Control Laboratory Manager</b> <b>Carine ASSELIN</b> (Date and signature):</p> <p>23 MAR 2017 </p>
--	---

amatsigroup

www.amatsigroup.com

AN003 V1

Rapport d'analyse



ALGAIA

91 rue Edouard Branly

50000 Saint Lô

[www.algaia.com](http://www.algaia.com)

Amatsi group

Parc de Génibrat

CHU X. Bichat, Université Paris Diderot

31470 FONTENILLES

Date : 24/03/17

**Analysis of fucoidan extract and final product containing  
fucoidans**





## Table of content

I- Samples and analyses .....	2
II- Protocols.....	2
III- Results .....	2
Raw material analysis .....	2
Analysis of the reconstituted vials.....	3

### I- Samples and analyses

A sample, white powder labelled PF.797.IS and vials containing lyophilised powder had been received for analysis. The analysis performed on those sample are fucoidan content and composition.

### II- Protocols

The raw material powder, labelled PF.797.IS is solubilized in MilliQ water to a final concentration of 10 mg/ml. The lyophilised powder in the vial, labelled “PJT0008-SAU170009, fucoidane lyophilisat PF.797.IS, T0” are solubilized in 1 ml of MilliQ water before analysis.

After acid hydrolysis, the monosaccharide profile and sulphate content are identified and quantified by High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC). Glucuronic acid was quantified by colorimetric method.

### III- Results

#### Raw material analysis PF.797.IS

The composition of the powder is summarized in Table 1. The results are expressed as percentage in the powder.

*Table 1 Composition of the raw material*

	<b>PF.797.IS</b>
Fucose	31,68%
Galactose	2,79%
Xylose	10,50%
Mannose	3,73%
Sulphate	12,68%
Glucuronic acid	18,00%

AN003 V1

Rapport d'analyse



### Analysis of the vials

The vial is supposed to contain 40 µg of raw material analysed above, reconstituted in 1 ml of water. The Table 2 shows the expected results of compound content, in µg, of the reconstituted vial if the raw material content is 40 µg in 1 ml and the results obtained after analysis of the reconstituted vials received.

Table 2 Expected values (µg) and results of the reconstituted vial analysis (µg)

	Expected values	Vial 1	Vial 2
<b>Fucose</b>	12,67	13,92	13,56
<b>Galactose</b>	1,12	1,17	1,02
<b>Xylose</b>	4,20	3,84	4,08
<b>Mannose</b>	1,49	1,19	0,94
<b>Sulphates</b>	5,07	11,9	17,16

In average (excepted for sulphate content), the compound analysed corresponded to 38.64µg and 35.85µg of the raw material for vial 1 and 2 respectively. The highest differences were found regarding the mannose content.

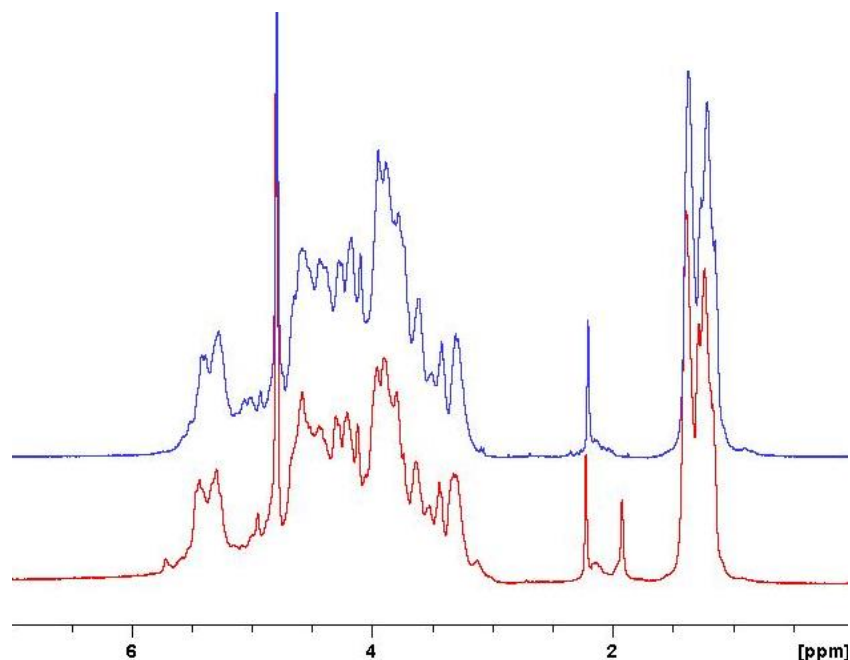
Jérémy BREBION



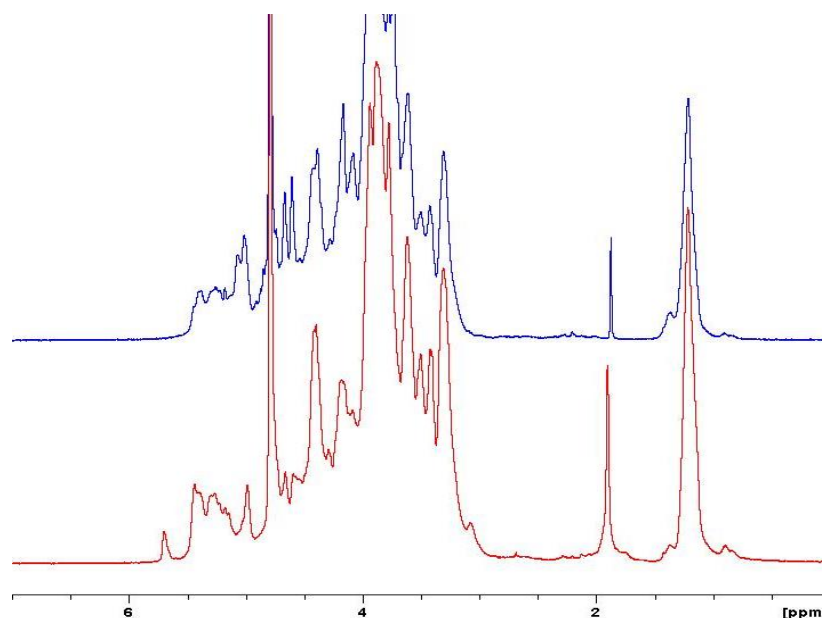


# Annexe F – Spectres RMN $^1\text{H}$ des produits méthacrylés

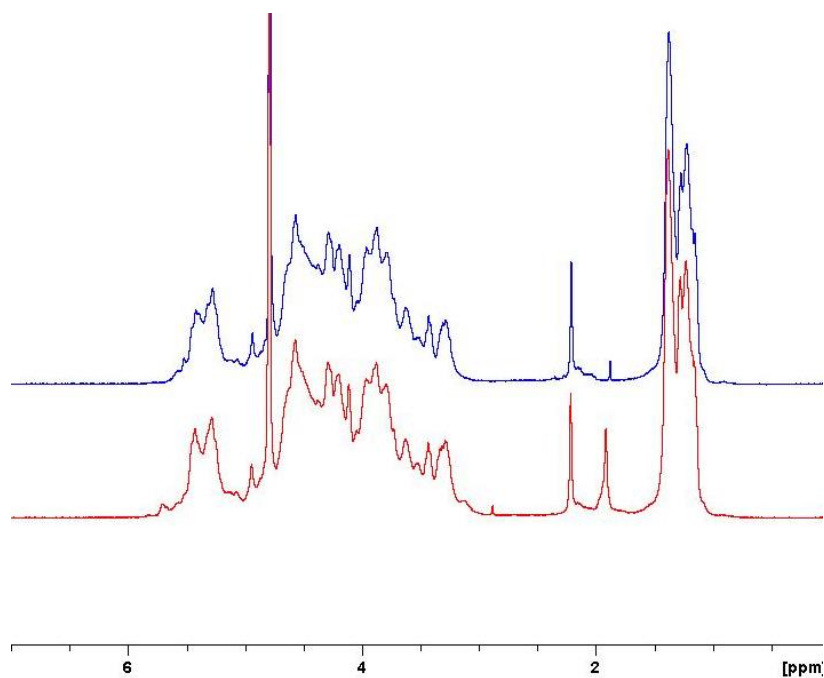
---



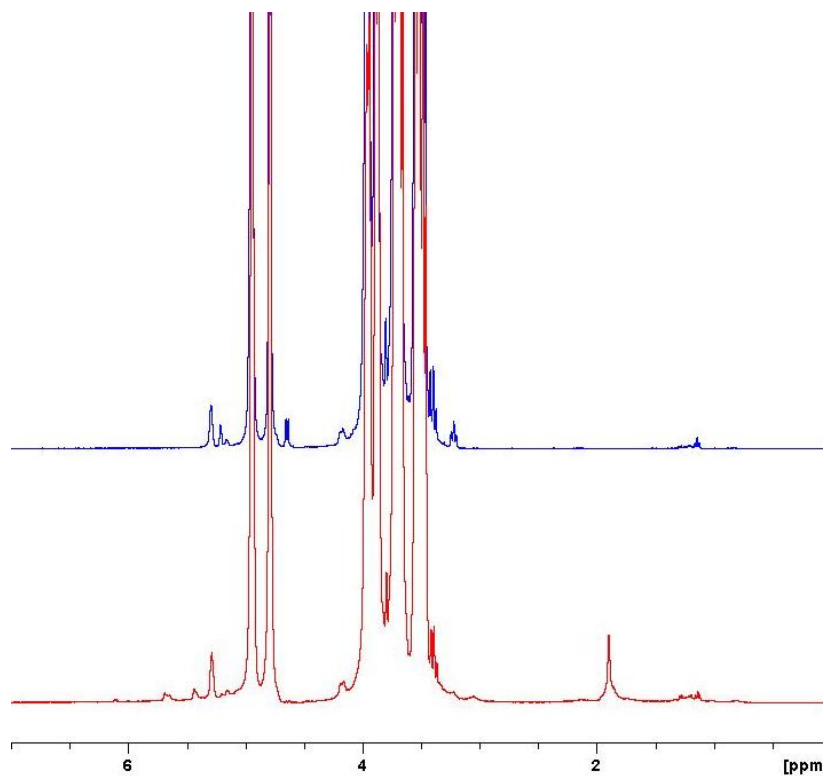
**Figure F.1** – Spectres RMN  $^1\text{H}$  (99,8%  $\text{D}_2\text{O}$ , 500MHz) d'Ascophyscient® dialysé en bleu et d'Ascophyscient® dialysé méthacrylé en rouge.



**Figure F.2** – Spectres RMN  $^1\text{H}$  (99,8%  $\text{D}_2\text{O}$ , 500MHz) d'une fraction IEC1 en bleu et d'une fraction IEC1 méthacrylée en rouge.



**Figure F.3** – Spectres RMN  $^1\text{H}$  (99,8%  $\text{D}_2\text{O}$ , 500MHz) d'une fraction IEC2 en bleu et d'une fraction IEC2 méthacrylée en rouge.



**Figure F.4** – Spectres RMN  $^1\text{H}$  (99,8%  $\text{D}_2\text{O}$ , 500MHz) de Dextrane T10 en bleu et de Dextrane T10 méthacrylé en rouge.

# Annexe G – Utilisation de Liquide Ionique pour la synthèse de fucoïdanes aminés

---

Les LI sont des sels formés par des anions et cations organiques dont certains sont liquides à température ambiante [328]. Selon les différentes combinaisons ioniques, les LI possèdent des propriétés physico-chimiques distinctes, telles que le point de fusion, la polarité, la viscosité, la capacité de solvation, etc., permettant d'obtenir des propriétés spécifiques à l'utilisation voulue. Par ailleurs, les LI possèdent des propriétés remarquables comme une faible tension de vapeur, une faible inflammabilité ou une grande stabilité thermique. Ces propriétés permettent de les utiliser dans de nombreux domaines comme la synthèse organique, la catalyse ou l'électrochimie [329]. Les LI possédant un point de fusion inférieur à 30°C, et donc liquide à température ambiante, ont la capacité de solubiliser des composés hydrophobes et hydrophiles leur permettant d'être utilisés comme solvant et/ou catalyseur [330]. La recyclabilité des LI constitue également une caractéristique très intéressante pour l'industrie et les laboratoires qui souhaitent limiter l'usage de solvants organiques. Les LI sont ainsi qualifiés de solvants verts.

Certains polysaccharides, en particulier les polysaccharides hautement sulfatés tels que les glycosaminoglycannes (GAGs), sont solubles uniquement dans l'eau et dans des solvants organiques fortement polaires [331] ou, à l'opposé, des polysaccharides insolubles dans l'eau tels que la cellulose [332], peuvent être solubilisés dans du LI. En outre, les LI ne modifient pas la structure chimique des polysaccharides, ils constituent un milieu réactionnel "non-dérivatisant", la capacité de dissoudre des polysaccharides étant intimement liée à leur capacité à accepter les liaisons hydrogènes [332]. Le benzoate de 1-éthyl-3-méthyl imidazolium ([EmIm][ba]) (Figure G.1) est un LI constitué de l'anion benzoate et du cation 1-éthyl-3-méthyl imidazolium. Son utilisation pour ses propriétés de liquide ionique a été rapportée pour la première fois en 1994 dans le domaine de l'électrochimie [333]. C'est un bon solvant et un catalyseur pour la réaction de peracétylation des polysaccharides sulfatés [331]. Des études ont montré que [EmIm][ba] est capable de bien dissoudre l'héparine et le sulfate d'héparane [331]. Nous avons donc orienté nos travaux vers l'utilisation de ce LI pour l'amination réductrice du fucoïdane.

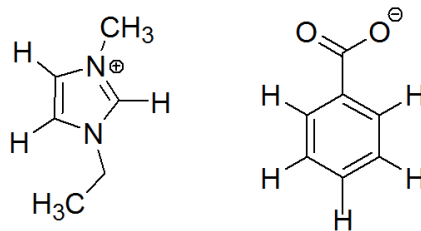


Figure G.1 - Benzoate de 1-éthyl-3-méthyl imidazolium.

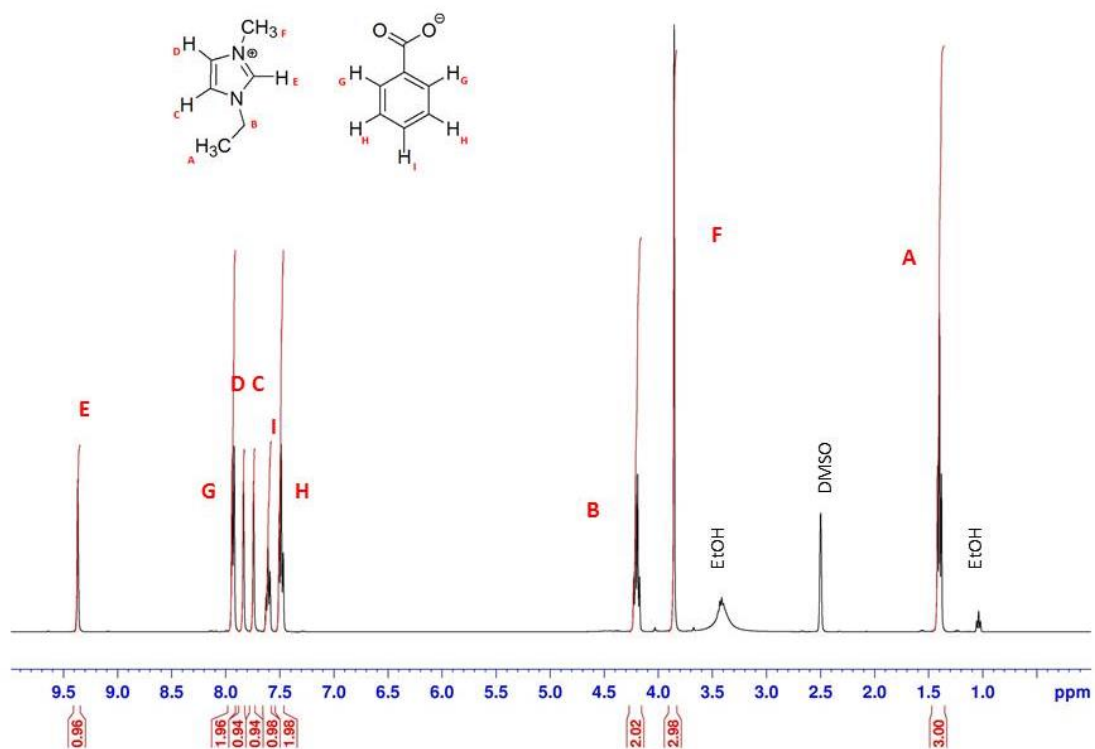


Figure G.2 – Spectres RMN <sup>1</sup>H (99,8% DMSO, 500MHz) du Benzoate de 1-éthyl-3-méthyl imidazolium.

Un plan d'expérience a été réalisé afin de déterminer avec le moins d'essais possible l'impact de trois facteurs sur le rendement d'amination : la température, le temps de réaction et le volume de 1,3-diaminopropane ajouté. Pour chaque paramètre, le niveau bas est codé -1 et le niveau haut est codé +1. Par exemple, pour la température de réaction, le niveau bas est 70°C, le niveau haut est 110°C, le niveau zéro est 90°C. Dans ces conditions, 8 expériences ont été réalisées dont les résultats sont présentés dans le Tableau G.1. Nous avons alors pu établir les coefficients du modèle de réaction d'amination, avec l'équation suivante:

$$Y = a_0 + a_1 * T + a_2 * t + a_3 * C + a_{1,2} * T * t + a_{1,3} * T * V + a_{2,3} * t * V + a_{1,2,3} * T * t * V$$

Y représente le taux d'amination, T représente la variable codée pour la température, t représente la variable codée du temps de réaction et V représente le variable codée pour le volume de diaminopropane (ces trois variables pouvant avoir 3 valeurs : -1, 0 et +1). Les 8 coefficients  $a_n$  sont calculés selon les relations suivantes:

$$a_0 = (18 + 54 + 15 + 39 + 28 + 73 + 34 + 84)/8 = 43,125$$

$$a_1 = (-18 + 54 - 15 + 39 - 28 + 73 - 34 + 84)/8 = 19,375$$

$$a_2 = (-18 - 54 + 15 + 39 - 28 - 73 + 34 + 84)/8 = -0,125$$

$$a_3 = (-18 - 54 - 15 - 39 + 28 + 73 + 34 + 84)/8 = 11,625$$

$$a_{1,2} = (18 - 54 - 15 + 39 + 28 - 73 - 34 + 84)/8 = -0,875$$

$$a_{1,3} = (18 - 54 + 15 - 39 - 28 + 73 - 34 + 84)/8 = 4,375$$

$$a_{2,3} = (18 + 54 - 15 - 39 - 28 - 73 + 34 + 84)/8 = 4,375$$

$$a_{1,2,3} = (-18 + 54 + 15 - 39 + 28 - 73 - 34 + 84)/8 = 2,125$$

Le modèle s'écrit donc sous la forme:

$$Y = 43,125 + 19,375T - 0,125t + 11,625V - 0,875T * t + 4,375T * V + 4,375t * V + 2,125T * t * V$$

Pour cette équation, si  $T = t = V = 0$ ,  $Y = 43,125$ . Afin de vérifier cette équation, il faut réaliser une réaction d'amination sous conditions au niveau zéro, c'est-à-dire à 90°C, 3 h de phase amination et 135  $\mu$ L de 1,3-Diaminopropane. Le résultat de l'essai de vérification est 47%, soit une erreur relative de 9%. Le modèle proposé est donc proche de la réalité. L'effet de chaque paramètre est présenté dans le Tableau G.2. La température et le volume de 1,3-diaminopropane influencent le plus le taux d'amination, l'« effet » est 19,375 et 11,625 pour les 2 paramètres, il faut donc augmenter la température et le volume de 1,3-diaminopropane pour augmenter le taux d'amination. Par contre, le temps

de réaction n'a que peu d'effet sur le taux d'amination final, on pourrait donc diminuer le temps réactionnel.

**Tableau G.1 – Matrice d'expérience.**

<b>N° essai</b>	<b>Température (T)</b>	<b>Temps de réaction (t)</b>	<b>Volume de diaminopropane (V)</b>	<b>Taux d'amination (%)</b>
1	-	-	-	<b>18</b>
2	+	-	-	<b>54</b>
3	-	+	-	<b>15</b>
4	+	+	-	<b>39</b>
5	-	-	+	<b>28</b>
6	+	-	+	<b>73</b>
7	-	+	+	<b>34</b>
8	+	+	+	<b>84</b>
Niveau -	70°C	2h	50 µL	
Niveau 0	90°C	3h	135 µL	
Niveau +	110°C	4h	220 µL	

**Tableau G.2 – Influence des paramètres.**

<b>Paramètre</b>	<b>Effet</b>
Température (T)	19,375
Temps (t)	-0,125
Volume (V)	11,625
T*t	-0,875
T*V	4,375
T*V	4,375
T*t*V	2,125

# Annexe H – Fonctionnalisation de NPs de PLGA avec GraftFast®

Le LVTS ayant déjà travaillé sur le développement de NPs fonctionnalisés avec des fucoïdanes [235, 251], nous avons réalisé un premier test de greffage en utilisant la technologie GraftFast® sur des NPs de Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA), un copolymère approuvé par la FDA. La première observation fût la diminution du potentiel Zêta (représentant la charge portée par les NPs) après la polymérisation comme présenté dans le Tableau DG.1. Cette diminution pouvant provenir de la dégradation des NPs lors de la réaction, la présence de sulfate a été testée et confirmée, indiquant la présence de fucoïdanes à la surface des NPs. On peut noter également une diminution du diamètre hydrodynamique des NPs après le greffage. Cette diminution peut-être expliqué par une contraction des chaînes polymériques à la surface des NPs de PLGA lors du greffage. Les deux populations restent mono-disperses avec des indices de polydispersité (PDI) proche de 0,1.

**Tableau H.1** – Diamètre hydrodynamique et potentiel Zeta de NPs de PLGA fonctionnalisées ou non par des fucoïdanes.

	<b>Diamètre hydrodynamique (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potentiel Zêta (mv) pH=7</b>
NP <sub>s</sub> PLGA	300,7	0,103	-2,90
NP <sub>s</sub> PLGA-Fuco	254,5	0,168	-22,5

Les NPs fonctionnalisées vont pouvoir être testées dans des études de cytométrie en flux afin de déterminer leur pouvoir d'interaction avec des cellules endothéliales ou des plaquettes activées.

Les résultats présentés dans le Chapitre 4 ainsi que les résultats préliminaires encourageants obtenus avec des NPs de PLGA ont permis la demande de financement d'un nouveau projet par l'ANR, projet incluant le LVTS, le CEA ainsi que la société Algues & Mer, pour le développement de NPs recouvertes de fucoïdanes pour le diagnostic et la thérapeutique de pathologies cardiovasculaires. L'évaluation du dossier par l'ANR est en court.





# Annexe I - Communications

---

## *Communication orale*

Fucoidan: a marine polysaccharide for SPECT diagnosis of thrombosis, *World Biomat Congress 2016*, Montréal, Canada, **2016**.

## *Posters*

Purification et fractionnement des fucoïdanes pour l'imagerie moléculaire, *Journées de l'école doctorale MTCI*, Paris, France, **2015**.

Covalent immobilization of a sulfated polysaccharide via GraftFast® technology on a Surface Acoustic Wave (SAW) sensor: Toward a tool to measure interactions with vascular biomolecules, *World Biomat Congress 2016*, Montréal, Canada, **2016**.

Un produit de la mer pour imager la thrombose, *1er forum Franco-Québécois d'innovation en santé*, Montréal, Canada, **2016**.

Process validation of fucoidans production for medical research purposes, *Biomat 2017*, Ambleteuse, France, **2017**.

## *Publication*

Fucoidans in nanomedicine, *Marine Drugs*, **2016**, 14, 145.



Review

## Fucoidans in Nanomedicine

Lucas Chollet <sup>1,2,3,†</sup>, Pierre Saboural <sup>1,2,†</sup>, Cédric Chauvierre <sup>1,2</sup>, Jean-Noël Villemin <sup>3</sup>,  
Didier Letourneur <sup>1,2</sup> and Frédéric Chaubet <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm, U1148, LVTS, University Paris Diderot, X Bichat Hospital, F-75877 Paris, France; lucas.chollet@algues-et-mer.com (L.C.); pierre.saboural@univ-paris13.fr (P.S.); cedric.chauvierre@inserm.fr (C.C.); didier.letourneur@inserm.fr (D.L.)

<sup>2</sup> Galilée Institute, University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, F-93430 Villetaneuse, France

<sup>3</sup> Algues & Mer, Kernigou, F-29242 Ouessant, France; jn.villemin@algues-et-mer.com

\* Correspondence: frederic.chaubet@univ-paris13.fr; Tel.: +33-1-4940-4090; Fax: +33-1-4940-3008

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Paola Laurienzo

Received: 17 June 2016; Accepted: 21 July 2016; Published: 29 July 2016

**Abstract:** Fucoidans are widespread cost-effective sulfated marine polysaccharides which have raised interest in the scientific community over last decades for their wide spectrum of bioactivities. Unsurprisingly, nanomedicine has grasped these compounds to develop innovative therapeutic and diagnostic nanosystems. The applications of fucoidans in nanomedicine as imaging agents, drug carriers or for their intrinsic properties are reviewed here after a short presentation of the main structural data and biological properties of fucoidans. The origin and the physicochemical specifications of fucoidans are summarized in order to discuss the strategy of fucoidan-containing nanosystems in Human health. Currently, there is a need for reproducible, well characterized fucoidan fractions to ensure significant progress.

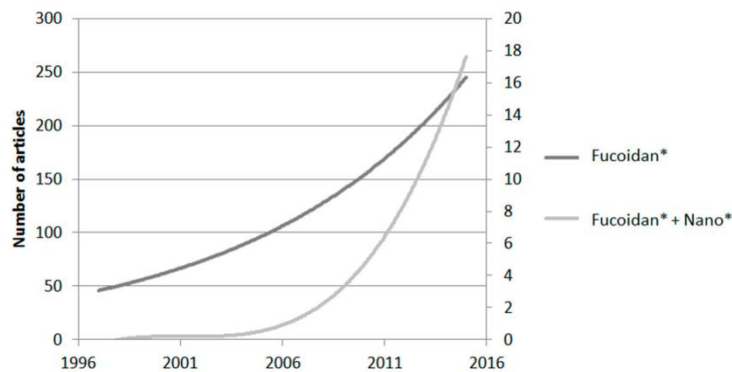
**Keywords:** fucoidans; nanomedicine; sulfated polysaccharides; nanosystems; drug delivery; imaging agent; tissue regeneration

---

### 1. Introduction

Fucoidans are abundant cost-effective marine polysaccharides which exhibit a wide spectrum of biological activities with potential clinical applications. For more than half a century, extensive works have been published about the activities of these molecules; some of the most recent reviews are listed in Table 1. Recently, nanomedicine began to incorporate the use of fucoidans especially in the domains of cancer, regenerative medicine, and cardiovascular diseases, fields in which nanotechnologies are making progress every day. Since 2005, reports on fucoidans in nanomedicine have increased to represent about 7% of the overall works in 2014 related to both topics (Figure 1).

This review focuses on the progress at the interface of fucoidans and nanomedicine in the perspective of development of new diagnostic and therapeutic tools for human use. In the first part, fucoidans and their biological properties are briefly presented and in the second part the main studies of fucoidans with regard to developments in nanomedicine are given. In the last part, we discuss the relevance of these studies in light of the structural data of fucoidans and we question an appropriate strategy for the development of fucoidans for human applications.



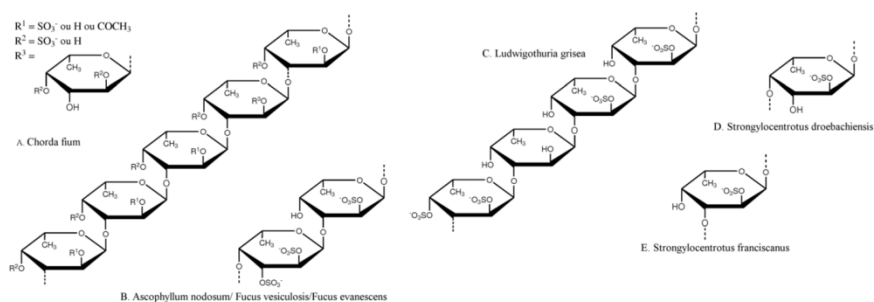
**Figure 1.** Evolution of published articles reporting fucoidans (from Web of Science). Left axis: number of articles for “Fucoïdan\*”, right axis: number of articles for “Fucoïdan\* + Nano\*”.

## 2. What Are Fucoïdants?

Fucoïdants belong to a large family of marine sulfated polysaccharides named fucans mainly constituted of sulfated L-fucose, which include also ascophyllans (xylofucoglycuronan and xylofucomanuronan) and sargassans (glycuronofucogalactan) [1,2]. Fucoïdants were first discovered in 1913 by Kylin in brown algae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* and *Laminaria saccharina* [3]. Since then, fucoïdants have been identified in 70 more species of brown algae (*Phaeophyceae*) [4–12], in the body wall of some marine invertebrates such as sea cucumber (*Holothuroidea*), and in the egg jelly coat of sea urchins (*Echinoidea*) [4,13,14].

Fucoïdants are contained in the extracellular matrix (ECM) of brown algae’s cell walls [1]. Considering the eco-physiological influences (alga species, location and season of harvesting, the position on the intertidal zone, etc.) on the composition of fucoïdants, they are implicated in the ionic and osmotic regulation and in the mechanical support of the cell wall [2,15]. Thus, the algae which have been most exposed to drying seem to contain the highest fucoïdan content. In sea urchin, fucoïdants play a role in the fertilization process since they are found in the surrounding coating of the female gamete (zona pellucida) and participate in the species-specific acrosome reaction [16,17]. In sea cucumber, fucoïdants could be involved in the structural support of the body wall in the saline environment, as for algae [18].

The chemical composition of fucoïdants is extremely variable depending on eco-physiological parameters. The first structure was elucidated in 1950 by Conchie and Percival from a fucoïdan extracted from *Fucus vesiculosus* [19]. Kloareg et al. determined that fucoïdants were composed of 50%–90% of L-fucose, 35%–45% of sulfate and less than 8% of uronic acid with a linear backbone based on an  $\alpha(1\rightarrow2)$ -glycosidic linkage of O-4 sulfated L-fucose and some oses like galactose, mannose, xylose, and glucose [1,2]. In 1993, Patankar et al. published a revised structure of a commercial fucoïdan from *F. vesiculosus*: mainly an  $\alpha(1\rightarrow3)$ -L-fucose linear backbone with sulfate substitution at O-4 and some  $\alpha$ -L-fucose branched at O-4 or O-2 [20]. Thereafter, studies on fucoïdants’ structure evidenced different repeating units for highly purified fucoïdan fractions from different species [21–28]. Structures are based on an  $\alpha(1\rightarrow3)$ -L-fucose backbone with some alternating  $\alpha(1\rightarrow4)$  linkages. The sulfation patterns are variable but sulfate groups are mainly found at O-2 and O-4 [29,30]. Fucoïdants extracted from marine animals have a more regular chemical structure (Figure 2).



**Figure 2.** Repeating chemical structures of some fucoidans from brown algae (A) *Chorda filum* [28]; (B) *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, and *Fucus evanescens* [22,23,31] and from marine invertebrates: sea cucumber (Holothuriodea) (C) *Ludwigothuria grisea* [29]; (D) *Strongylocentrotus droebachiensis* [17], and (E) *Strongylocentrotus franciscanus* [30].

There are almost as many methods of extraction of fucoidans from brown algae as there are studies dealing with these polysaccharides. However a general pattern can be proposed: a first extraction with organic solvents (e.g., acetone, toluene, etc.) from the fresh materials provides dried extracts which can be treated with methanol, ethanol or formaldehyde to remove hydrophobic compounds like dyes and lipids. The remaining alginates are precipitated with calcium, followed by acidic and sometimes alkaline hydrolyses at temperatures ranging from ambient up to 100 °C, enabling both to discard non-fucoidan polysaccharides (in particular laminarin) and decrease the molecular weight of the fractions. More recently, microwave assisted extractions have been developed [32]. The extraction conditions influence the final chemical composition of the fucoidan fractions [9,12] which remain complex mixtures of macromolecular species with large molecular weight distributions (100–1000 kDa). Although it is now widely admitted that the term “fucoidan” refers to a sulfated-L-fucose based polymer, it is still not possible to speak of a single compound; “fucoidans” should always be used as a generic term as was first proposed by Larsen in 1966 [33] and a fraction specifically prepared should be referred to as “a fucoidan fraction”(FF). Both terms will be used in this review.

The bioactivities of low molecular weight FF were found to mimic those of heparin, a glycosaminoglycan of animal origin with a molecular weight of about 15 kDa. As a consequence, depolymerization methods of raw fucoidans were developed: by acid hydrolysis [9], by radical cleavage [34], by enzymatic degradation (fucoidanases) from bacteria as well as digestive secretion of mollusk [35–39], and by gamma irradiation [40–42]. These methods could often cause structural alteration (like debranching and desulfation) likely affecting the biological activities. An alternative approach to extraction methods is the synthesis of FF, either with enzymes or through a full chemical process. Fucoidanases, enzymes extracted from marine invertebrates, marine fungi or bacteria, are able to selectively degrade the fucose-based backbone of fucoidans offering structurally well-defined and biologically active fragments. Silchenko et al. isolated several fucoidanases [37,43] and developed a method for the screening and the detection of these enzymes in bacterial colonies [39]. Nifantiev et al. achieved the chemical synthesis of oligofucosides up to hexadecafucosides [44,45] with controlled sulfation patterns, allowing different types of FF to be obtained: some fractions were built up of (1→3)-linked  $\alpha$ -L-fucose residues similar to the one found in *Laminaria saccharina* [24,27] or *Chorda filum* [28] and others were built up of alternating (1→3)- and (1→4)-linked  $\alpha$ -L-fucose residues as found in *Ascophyllum nodosum* or *Fucus evanescens* as examples. These bottom-up approaches could be used to synthesize a wide range of FF with well-defined structures, improving the knowledge in the structure-biological activity relationships for these molecules. Although, tremendous progress in glycobiology and glycomedicine has driven the development in oligosaccharide synthesis [46], either with the aid of enzymes or by full synthesis, industrial preparation of tailor-made FF remains still hard to achieve due to low overall yields and the



time needed to complete the process. Interestingly, there is currently no standard method to obtain reproducible bioactive well defined FF either from top-down or bottom-up strategies.

### 3. Biological Properties of Fucoidans

The interest of the scientific community in fucoidans and their low molecular weight fractions (i.e., below 30 kDa) is mainly driven by the wide spectrum of biological activities evidenced from their discovery up to now. Table 1 gathers the main biological effects reported and the identified targets. Over the last decades, new functions of polysaccharides and more specifically low molecular weight (LMW) fractions have attracted the interest of scientists for their ability to act in a wide variety of biological processes [47]. Structural variations such as degrees of substitution with chemical groups (in particular carboxylates, acetates or sulfates) are implicated in biological responses [48,49] and their activities are often attributed to their negative charges and sulfation degrees rather than to any specific carbohydrate structure as described for heparin [50]. Low molecular weight fractions from mammalian, glycosaminoglycans (GAGs) and more particularly low molecular weight-GAGs from heparin, heparan sulfate, hyaluronate, and chondroitin sulfate are implicated in a wide variety of biological processes as cofactors for growth factor, cytokines and chemokines production, tumorigenesis, signaling molecules in response to infection or other cellular damage, regulator of blood coagulation, and assisting viral and bacterial infections [51–53], the most active compounds being neutral or anionic structures partially acetylated or sulfated.

So far, multiple targets have been identified in blood and tissues to explain the biological activities of fucoidans. The anticoagulant activity, one of the most studied with reference to heparin, can be explained by the interactions of fucoidans towards natural thrombin inhibitors, serpins antithrombin, and heparin cofactor II, enhancing their activity [11]. P- and L-selectins, membrane proteins which play a role in the leukocyte rolling and extravasation process in vascular inflammatory response, have been reported and studied as the main targets in the anti-inflammatory activity of fucoidans [54,55]. Likewise, the inhibition of complement activation through classical and alternative pathways, also responsible for fucoidans anti-inflammatory activity, occurs by inhibiting formation or function of several complement's enzymes such as C4, C4b,2a, C3, and C3b,Bb [56].

**Table 1.** Biological properties of fucoidans and identified targets.

Biological Properties	Identified Targets	References
Anticoagulant/anti-thrombotic	Antithrombin, heparin cofactor II	[11,34,57–59]
Anti-complement	C4, C4b,2a, C3, and C3b,Bb	[56,59,60]
Anti-viral	CD4	[61–68]
Anti-inflammatory	P-selectin and L-selectin	[54,55,59,69–76]
Angiogenic effect	VEGFs, bFGF, FGF-2/α6, β1, and PECAM-1 integrin subunits	[10,11,54,59,77–87]
Anti-cancer	Caspases-3, -8 and -9, MAPK and their inhibitors, HIF-1	[29,88–110]
Anti-diabetic	α-glucosidase, α-amylase	[111–118]
Immune potentiating	NK cells, T-cells, dendritic cells	[119–123]
Antioxidant	-	[124–141]

Antiviral activity is ensured by the binding of fucoidans to the CD4 glycoprotein on T lymphocytes, an essential immunoglobulin in the infection process of host cells by the viruses [67]. Fucoidans, especially fucoidans with high sulfation content, inhibit α-glucosidase and α-amylase, two digestive enzymes, increasing or interrupting the absorption delay of glucose. The most sulfated fractions have an inhibitory effect more pronounced than the less sulfated ones and electrostatic interactions are likely involved [112,113]. In tissues, fucoidans have an effect on several enzymes responsible for mitosis or cellular apoptosis such as caspases-3, -8 and -9 or mitogen-activated protein kinase (MAPK) and their inhibitors [91,92,102], enhancing or silencing these factors in opposite ways in cancer cells or healthy cells (protective effect). Furthermore, LMW fucoidan fractions inhibit the accumulation of hypoxia-inducible factors-1 (HIF-1) which promote tumor angiogenesis in cancer cells [99].

The biological activities of fucoidans seem mainly modulated by their molecular weight and their sulfate content, which, as previously stated depend on the starting material and the method

of preparation. One of the most striking examples is the anti/pro-angiogenic activity. Pomin et al. evidenced that fucoidans of various origins exhibit an anti-angiogenic activity due to their ability to interfere with vascular endothelial growth factors (VEGFs) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) [11]. However, Matou et al. showed the pro-angiogenic effect of fucoidans, also extracted from *Ascophyllum nodosum*, by enhancing the expression of  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ , and PECAM-1 integrin subunits on the surface of endothelial cells, resulting in an increase of FGF-2-induced angiogenesis [85]. Nifantiev et al. reviewed numerous studies on the angiogenic activities of fucoidans from different brown algae to highlight structure-activity relationships. They could only conclude that FF from *Ascophyllum nodosum* with MW over 30 kDa exhibited anti-angiogenic activity whereas FF with MW lower than 30 kDa exhibited pro-angiogenic activity [10].

Fucoidans exhibit several bioactivities against a wide spectrum of pathological situations with a remarkable absence of adverse effects. On one hand, it is now widely accepted that levels of L-fucose and sulfate as well as the molecular weight are major structural parameters whose variation affect the biological properties. On the other hand, each algae species produces its own type of fucoidan whose composition also depends on the conditions of obtaining. Pharmaceutical grade fucoidans with well-defined molecular weight distributions and thoroughly defined chemical compositions are now needed. It is necessary to obtain proper structure-activity relationships in order to select the most relevant FF for human clinical trials.

#### 4. Fucoidans in Nanomedicine

Nanomedicine, also defined as nanotechnology in the biomedical field, has gained considerably in interest in the last decade. Nanosystems, such as, in a non-exhaustive way, nanoparticles, polymeric carriers, nanotubes, micelles, and liposomes have size-dependent properties and nanometer-scale dimensions which play important roles in biological systems. For half a century, they have been developed for therapeutic and diagnostic purposes and more recently have found tremendous applications in regenerative medicine with the development of nanostructured biocompatible scaffolds for cell organization and proliferation [142]. Moreover, nanotheranostics or theranostic nanomedicines have also been developed combining diagnosis and therapy to monitor both the release and the bioavailability of the drug at the proper pathological site [143]. The major interest of nanomedicine remains for drug delivery and personalized medicine defined as “the right drug to the right patient at the right moment” [144,145]. Most of these new biomedical tools are currently employed for treatments via oral or parenteral administration to fight cancer, iron deficiency or multiple sclerosis as examples [142]. Lovrić et al. reviewed the marketed products and those with the greatest potential [142].

Sulfated polysaccharides, especially fucoidans have been included in nanosystems for diagnostic, drug delivery, and tissue engineering [146,147]. Fucoidans have also been used as stabilizers of nanoparticles (NPs) [148–152] or to study the behavior of the aqueous suspension of chitosan/fucoidan-based NPs [153–155]. These works will not be detailed here since this review is dedicated to FF-containing nanosystems with direct applications to diagnosis and therapy. Table 2 assembles such applications, mainly with fucoidan-containing nanoparticles (FNPs), and the most relevant are explained in the following text. Table 3 indicates the origin and physicochemical data of FF used in these 31 reported studies.

**Table 2.** Applications of fucoidan-containing nanosystems in nanomedicine.

Application	References
Imaging agent	[156–162]
Protein delivery	[163–167]
Small drug delivery	[168–176]
Anti-coagulant	[177,178]
Gene delivery	[179,180]
Regenerative medicine	[181–186]

Table 3. Features of the fucoidan fractions used in nanomedicine related studies.

Study	Objective	Origin of Fucoidans	Molecular Weight	Sulfate Content *	Other Data	Remarks
Bonnard et al. [157,159]	P-selectin targeting FMPs for SPECT imaging	<i>F. vesiculosus</i>	57 kDa/23 kDa	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Changotade et al. [185]	Pretreatment of bone tissue substitute	-	-	-	-	-
Da Silva et al. [178]	FNFs preparation for therapeutic purposes	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Huang et al. [169]	Gentamicin controlled release	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Huang et al. [174]	Curcumin controlled release	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Huang et al. [165]	FGF-2 controlled release with FNFs	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Huang et al. [166]	SDF-1 controlled release with FNFs	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Jeong et al. [182]	Design of a scaffold for bone tissue regeneration	-	-	-	-	-
Jin et al. [186]	Design of a scaffold for bone tissue regeneration	<i>U. pinnatifida</i>	-	-	-	Commercial fucoidans from Haewon Biotech Company
Kimura et al. [172]	Evaluation of cytotoxic effects of FNFs	<i>C. okamuranus</i>	2–10 kDa	-	-	Fucoidans extracted and purified by the authors
Kurosaki et al. [180]	DNA delivery with FMPs	-	-	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Lee et al. [171]	DOX controlled release with FNFs	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Lee et al. [187]	Electrospun mats for Tissue engineering	<i>U. pinnatifida</i>	-	34.2%	62.12% total polysaccharide	Commercial fucoidans from Haewon Biotech Company
Li et al. [162]	P-selectin targeting FMPs for PET imaging	-	-	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Lira et al. [188]	Preparation and evaluation of FNFs	<i>S. cymosum</i>	53 kDa	-	-	Fucoidans extracted and purified by the authors

Table 3. Cont.

Study	Objective	Origin of Fucoidans	Molecular Weight	Sulfate Content *	Other Data	Remarks
Lowe et al. [183]	Design of a scaffold for bone tissue regeneration	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Nakamura et al. [164]	FGF-2 controlled release	<i>K. crassifolia</i>	-	-	-	Fucoidans extracted and purified by the authors
Park et al. [167]	ALA controlled release with FMNs	-	-	-	-	Commercial fucoidans from Haewon Biotech Company
Pinheiro et al. [176]	PLL controlled release	<i>F. vesiculosus</i>	57.26 kDa	-	40.2% Fuc, 2.98% Xyl, 0.55% Man, 3.6% Gal, 9.17% Ur, Ac, 0.11% Rha, 0.21% Glu	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Puvanewary et al. [184]	Design of a scaffold for bone tissue regeneration	<i>F. vesiculosus</i>	-	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Sezer et al. [179]	DNA delivery with EMPs	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Sezer et al. [189/190]	FNP's for dermal burns treatment	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa	-	-	Commercial fucoidans from Sigma Aldrich Company
Suzuki et al. [191]	P-selectin targeting FNPs for MRI imaging	<i>A. nodosum</i>	8 kDa	27%	45% L-fucose, 25% D-glucuronic acid	Commercial fucoidans from Algues et Mer Company
Venkatesan et al. [181]	Design of a scaffold for bone tissue regeneration	-	-	-	-	-
Wu et al. [175]	Berberine controlled release	-	80 kDa	-	-	Commercial fucoidans from NOVA Pharma & Liposome Biotech Company
Yu et al. [168]	Berberine controlled release	<i>L. japonica</i>	-	24.3%	3.5% carboxyl groups	Commercial fucoidans from NOVA Pharma & Liposome Biotech Company
Yu et al. [96]	Oversulfated FF release via oral route	<i>F. vesiculosus</i>	80 kDa	41.7%	-	Commercial fucoidans from NOVA Pharma & Liposome Biotech Company

\* g/100 g.



#### 4.1. Fucoidans in Therapeutic Nanosystems

In 2006, Sezer and Akbuga were the first to design FNPs named “fucospheres” from mixtures of fucoidan and chitosan for drug delivery purposes [163]. Two years later, they demonstrated the efficacy of fucospheres from the same origin over chitosan-based NPs in the treatment of dermal burns in rabbits [189,190]. The fucospheres size ranged from 300 nm to 1000 nm with surface charges from +6 to +26 mV and were tested in vitro on freshly excised chicken back skin. Then, in vivo tests were conducted on rabbits with the most efficient FNPs and the authors observed the highest level of wound healing after 21 days in groups treated with fucospheres as compared to those treated with chitosan microspheres or FF solution. FF has been found to accelerate the healing effects on dermal burns when coupled with chitosan which is able to re-epithelize and encourage fibroblast migration to the burn sites.

At the same time, Nakamura et al. designed FF/chitosan microparticles loaded with fibroblast growth factor 2 (FGF-2) [164]. FF was purified from the starting material with calcium chloride. FGF-2-loaded microparticles were then subcutaneously injected and neovascularization was observed in ischemic tissue in a mice model.

In 2013, another group synthesized FGF-2-loaded spherical nanoparticles, by dripping a mixture of FF and FGF-2 into a solution of chitosan under stirring [165]. This study evaluated the release of the growth factor in vitro and its effect on the differentiation of PC12 neural progenitor cells evidencing a synergistic activity on nerve cell growth as compared to FGF-2 in solution alone.

Chitosan/FF/tripolyphosphate NPs were synthesized and loaded with stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a therapeutic agent for tissue regeneration by Huang et al. [166]. FNPs were efficient in protecting SDF-1 from inactivation by proteolysis, heat, and pH and the released SDF-1 was able to improve the proliferation and the migration of rat mesenchymal stem cells for up to seven days.

In 2009, Sezer et al. also used fucospheres to encapsulate and to deliver plasmid DNA encoding GM-CSF [179]. The diameter ranged from 150 to 400 nm with a zeta potential from 8.3 mV to 17.1 mV depending on the chitosan molecular weight. The encapsulation capacity was evaluated between 84% and 95% depending on the chitosan molecular weight and the amount of plasmid added to the loading solution. Once encapsulated in fucospheres, the plasmid was released in vitro and its integrity was validated. No tests on cells or in vivo experiments have been published yet.

The same year, Kurosaki et al. developed a ternary complex FF/pDNA/Polyethylenimine [180]. The complexes had 72 nm mean diameter and  $-27$  mV zeta potential. FNPs were tested on B16-F10 mouse melanoma cells to assess the uptake and the transfection efficiency in vitro. They showed no cytotoxicity as compared to the pDNA/PEI NPs after 2 h of incubation and a concentration of 10 mg/mL of pDNA. However, when added to the B16-F10 cells, FNPs showed significantly lower uptakes and gene expression as compared to fucoidan-free NPs.

Pinheiro et al. synthesized chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules (FNCs) as a vector for the controlled release of poly-L-lysine (PLL), a polypeptide exhibiting strong antimicrobial activity, as a drug model [176]. Ten chitosan/fucoidan layers were formed over a polystyrene core removed after synthesis by repeated dipping in THF. The encapsulation of PLL was better when performed during the formation of the NCs. The encapsulation efficiency and the loading capacity of FNCs strongly depended on the initial PLL concentration used, with the highest values obtained at a PLL concentration of  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . PLL release from the FNCs was found to be pH-dependent with a maximum at pH 2 due to a weakening of the nanocapsules interpolyelectrolyte structure and suggested a peculiar release behavior. Due to the bioactivities and non-cytotoxicity of FF and chitosan, FNCs were envisaged by the authors as nanocarriers to protect and release bioactive compounds for food and pharmaceutical applications.

Yu et al. prepared chitosan-based beads embedded with FNPs for oral delivery of berberine, an antimicrobial agent used to inhibit the growth of bacteria in the digestive system [168]. The NPs/beads complexes inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in simulated gastric or intestinal fluids. Complexes also demonstrated a delayed drug release over

24 h in simulated gastric fluid, which could be suitable for later drug delivery to the small intestine. Another group developed chitosan/fucoidan-aurine conjugate NPs to deliver berberine via the oral route to treat defective intestinal epithelial tight junction barrier [175]. The release of berberine was found to be pH-dependent with higher release at intestinal pH (7.4) than gastric pH (2.0). In vitro, the authors demonstrated the protective effect of the FNP on Caco-2 cell monolayer, as a model of the epithelial barrier, co-cultured with LPS-treated RAW 264.7 cells. The results suggested the utility of such FNPs in allowing local delivery of berberine on bacterial-derived lipopolysaccharides intestinal epithelia tight junction disruption, to restore barrier function in inflammatory and injured intestinal epithelium.

Huang et al. developed antioxidant FNPs for antibiotic delivery to the lungs [169]. The use of FF was explained by their antioxidant and anti-inflammatory properties in order to treat pulmonary allergic inflammations. FNPs size ranged from 230 nm to 250 nm and their compactness and stability were maintained for 25 days. They exhibited highly potent antioxidant effects by scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and reducing the concentration of intracellular reactive oxygen species (ROS) as well as superoxide anion in stimulated macrophages. As an antibiotic model drug, Gentamicin (GM) was used for controlled release assays in vitro. The FNPs released 99% of GM over 72 h after an initial 10 h burst release. They were considered as potential carriers for antibiotics delivery to the lungs in the case of pulmonary infections and to be useful to treat airway inflammatory diseases.

In order to deliver drugs with low solubility and high pH sensitivity, Huang et al. developed *O*-carboxymethyl chitosan/fucoidan NPs to increase cellular curcumin uptake (Cur), a polyphenolic compound exhibiting several biological activities such as antitumor, antioxidant, inhibiting cardiovascular diseases, and inducing apoptosis [174]. Cur-loaded FNPs (Cur-FNPs) had an average diameter of 270 nm and encapsulated 92.8% of the drug. Cur-FNPs considerably decreased the cytotoxicity of Cur to mouse fibroblasts cells (L929), were stable in the gastric environment (pH 2.5), and allowed the release of Cur in the simulated intestinal environment (pH 7.4). The cellular uptake of Cur-FNPs was evaluated using Caco-2 cells. An internalization of Cur-FNPs by the cells through energy-dependent endocytic pathways was observed making *O*-carboxymethyl chitosan/fucoidan NPs potential carriers in oral delivery systems.

Park et al. prepared core/shell microparticles by co-axial electro-spray drying [167]. FF was mixed with the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid (ALA). The size of the microparticles ranged from 5.4 to 8.4  $\mu$ m. FF and ALA were detected within the core, and the chitosan within the shell of the microparticles. These composite microparticles were able to gel by water uptake and then swelled, contrary to the physical mixture of FF and chitosan; the swelling was found to depend on pH with a decrease for pH values higher than 7. In the same way, decreasing the chitosan/FF ratio lowered the swelling of the hydrogel. Finally, the release behavior of ALA from the gel was validated in vitro in different pH media by applying different electric potentials, inducing the drug release. The cumulative amounts of released ALA were quantified over 48 h to conclude that not only a declining concentration gradient occurred but also that the physical gelation between FF and chitosan over time reduced the diffusion of ALA, resulting in a unique release behavior with possible applications in drug delivery systems, wound healing dressings or scaffolds.

Lee et al. combined the immunotherapeutic activity of an acetylated FF with self-organized nanospheres loaded with doxorubicin (DOX) [171]. FNPs reached a 71% loading efficiency and the release followed a first order kinetic. FNPs were incubated for 24 h with RAW-264.7 macrophages, then tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) expression levels were measured. TNF- $\alpha$  expression was improved by a factor of 1.13 and GM-CSF by a factor of 1.86 as compared to unloaded FNPs and free DOX in a multidrug resistant cell model. Finally, these FNPs were considered as good candidates for combined immunotherapy and chemotherapy.

In the development of an oral drug delivery system, chitosan was found to modulate the opening of the tight junctions of epithelial cells [177]. Da Silva et al. prepared fucospheres with anti-coagulant properties for oral delivery by a nanocoagulation [178]. The size of FNPs ranged from 198 to 352 nm

mean diameter and their zeta potential was measured between 35 and 53 mV. The anticoagulant activity of aqueous suspensions of these fucospheres was not found significantly different from that of FF, and FNPs did not show cytotoxicity for Caco-2 cells up to 1 mg/mL after 3 h of incubation.

At the same time, Yu et al. designed fucospheres to release an over sulfated FF via the oral route [96]. FNPs were able to go through a Caco-2 cell monolayer by opening the tight junctions. Eventually, it was found that released over sulfated FF had a higher anti-angiogenic activity than native FF.

By mixing FF and soybean lecithin in a homogenizer, Kimura et al. prepared unilamellar liposomes mixed with FF (FFL) of 100 nm and compared their cytotoxic effects with the native FF on osteosarcoma in vitro and in vivo [172]. FFL were found to reduce the viability of human osteosarcoma cell line 143B in vitro with a maximum inhibition for 2 mg/mL of liposome and 72 h of incubation. In addition, FFL were more potent than FF to induce apoptosis in cells. Mice were inoculated with murine osteosarcoma LM8 tumor cells and treated with FFL or native FF. FFL induced a reduction of the volume and the weight of the tumor compared to FF-treated mice.

Lira et al. compared in 2011 the cytotoxicity on macrophages and fibroblast murine cell lines of FNPs obtained by coating poly(isobutylcyanoacrylate) (PIBCA) with a blend of dextran and FF with two methods, a redox radical emulsion polymerization (RREP) and an anionic emulsion polymerization (AEP) [188]. FNPs prepared by the former were four times less toxic than those prepared by the latter. The authors also observed that FNPs obtained by RREP were not stable with a ratio FF/dextran of over 25, while FNPs obtained by AEP were stable in suspension with 100% FF as coating material.

#### 4.2. Fucoidans in Diagnostic Nanosystems

Nanosystems for diagnosis must be blood compatible and non-toxic at concentrations sufficient for recording relevant images of the region of interest. To a large extent, sulfated polysaccharides could meet these criteria as vectors of imaging markers. Among these, fucoidans have been evidenced as good candidates to image atherothrombosis in vivo [156,191], and still awaited are studies evidencing their usefulness for cancer imaging.

In 2011, Rouzet et al. showed the direct complexation of  $^{99m}\text{Tc}$  by a commercial FF allowing SPECT imaging of thrombosis and heart ischemia thanks to the interaction of FF with P-selectin overexpressed by activated platelet and activated endothelium [158]. Biodistribution studies of  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled FF in rat by SPECT imaging evidenced a urinary elimination and a moderate liver and spleen uptake which decreased with a fraction obtained from treatment with calcium ions of FF [160].

With the same FF, Suzuki et al. evidenced the capacity of superparamagnetic FNPs to detect in vivo the intraluminal thrombus of abdominal aortic aneurysm in a rat model with a 4.7 T MR Imager [191]. FNPs were obtained by linking FF to the carboxymethyl-dextran shell of Ultrasmall Superparamagnetic Iron oxide (USPIO). FNPs had a size of 50 nm and a zeta-potential of  $-14.3$  mV. Surface Plasmon Resonance experiments evidenced an affinity of the FNPs for P-selectin in 1–10 nM range compared to NPs coated only with carboxymethyl-dextran, in accordance with previous work of Bachelet et al. [55]. Other in vitro studies showed the capacity of these FNPs to bind to activated human platelets [156].

Bonnard et al. developed polysaccharide-based NPs from dextran and pullulan cross-linked with sodium trimetaphosphate (STMP) in a water-in-oil emulsion [157,161]. FF was added to the emulsion to provide NPs functionalized with fucoidans (FNPs) with an average hydrodynamic diameter of 358 nm and a zeta-potential of  $-16$  mV. MPFs contained about 1.6% (*w/w*) of FF and energy dispersive X-ray (EDX) spectrum showed the presence of FF at the surface of the particles. The interaction of MPFs with activated human platelets was validated in vitro. MPFs were radiolabeled with  $^{99m}\text{Tc}$  [158] and used to image an aneurysmal thrombus in a rat model. Iron oxide embedded MPFs showed a high affinity for activated Human platelets in vitro and MR images of aneurysmal thrombus and activated endothelium were also obtained in murine models [159]. In another study, the authors developed MPFs containing



USPIO for magnetic resonance imaging [159]. On animal models a significant contrast enhancement of thrombus was obtained from 30 min to 2 h after the injection of MPFs.

In 2014, Li et al. developed a contrast agent for PET imaging [162]. FF was labelled with gallium 68 to image vulnerable active atherosclerosis plaques expressing P-selectin. After the validation with *in vitro* and *ex vivo* studies, they localized atherosclerotic plaques on an apolipoprotein E-deficient mice model using PET imaging. Anatomic structures of plaque were confirmed by 17.6 T MRI to correlate their results. The P-selectin affinity PET tracer was found to discriminate active and inactive atherosclerotic plaques.

#### 4.3. Fucoidans in Regenerative Medicine

Marine polysaccharides have been used for years to design scaffolds for tissue engineering due to their interesting bioactivities and their biocompatibility. Senni et al. reviewed the studies in this field [192]. Particularly, fucoidans have raised interest in the design of biocomposites, especially for bone tissue engineering. So it is not surprising to find now the most advanced developments in this domain although there are still comparatively very few studies.

In 2008, Changotade et al. treated a commercial bone substitute (Lubroc<sup>®</sup>) with a low molecular weight FF (LMWF) to improve bone regeneration [185]. The authors found out that the pretreatment of the bone substitute with LMWF promotes human osteoblast proliferation, collagen type I expression and favors alkaline phosphatase activity enhancing the mineralization of the bone tissue. Regarding the origin and structure of LMWF used, the authors refer to older works without specifying any product parameter used in their study.

Three years later, Jin et al. developed polycaprolactone (PCL)/fucoidan composite scaffolds for bone tissue regeneration [186]. PCL/FF scaffolds with a 300  $\mu\text{m}$  pore size dramatically increased the hydrophilic properties (with  $\geq 5$  wt % of fucoidans). In addition mechanical properties were improved even with a low fucoidan/PCL ratio (as an example: a 22% increase of Young's modulus at 10 wt % of fucoidans). The biocompatibility of the scaffolds was assessed on osteoblast-like-cells (MG63) evidencing a better cell adhesion to the surface of the FF-containing scaffolds with three times more mineralization compared to the pure PCL scaffold after 14 days of cell culture. At the same time, Lee et al. prepared a biocomposite of polycaprolactone (PCL) and FF [187]. The biocomposite showed a better distribution of osteoblast-like cells (MG63) compared to pure PCL mats. Furthermore, total protein content, alkaline phosphatase activity, and calcium mineralization were better and were higher with PCL/FF micro/nanofibrous mats suggesting that FF-complemented biocomposites would make good candidates for tissue engineering applications.

Since 2013, S. K. Kim's group has been developing scaffolds from hydroxyapatite/polysaccharide-based nanocrystals for bone tissue regeneration [181–183]. Chitosan/alginate scaffold (CAS) and chitosan/alginate/fucoidan scaffold (CAFFS) were first prepared. CAFFS with a pore size of 56–437 nm improved cytocompatibility, proliferation, and alkaline phosphatase secretion of MG63 osteosarcoma cells as compared to CAS. In addition, protein adsorption and mineralization were two times greater with CAFFS, which was attributed to the negative charges of FF sulfate groups. Then, they prepared scaffolds from hydroxyapatite (HapS) and hydroxyapatite mixed with FF (HapFFS) to induce FGF-2 activity and angiogenesis [182]. HapFFS showed a mineralization effect two times higher than HapS. Scaffolds obtained more recently by mixing HapFFS with chitosan evidenced a better mineralization as well as a good biocompatibility with mesenchymal stem cells (PMSCs) likely due to a suitable micro architecture for cell growth and nutrient supplementation [183]. Note that no data about the FF were provided for the two first studies.

In 2015, Puvaneswary et al. prepared tricalcium phosphate-chitosan-fucoidan biocomposite scaffold and demonstrated the benefic effect of FF [184]. They showed that the addition of FF in the scaffold increased the release of osteocalcin allowing the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells *in vitro*. Furthermore, FF was found to improve the compression strength and the biomineralization of the scaffolds.

## 5. Discussion

Fucoidan-containing nanosystems were first developed for the delivery of different therapeutic agents [147] followed by studies on regenerative medicine and more recently on diagnostics. Most of them focused on structures obtained from a mixture of FF and chitosan, a cationic polysaccharide with a random alternation of  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucosamine, and *N*-acetyl-D-glucosamine. The formation of these nanosystems occurs from electrostatic interactions between sulfate and ammonium groups to generate multilayer architectures stable over a wide range of pH values and suitable for oral or parenteral administration. Different methods were used to obtain fucoidan-containing nanosystems such as emulsion, self-assembly, coacervation, polyelectrolyte complexing or ionic cross-linking, all without risks of modification of the polymer structure. Although, in some cases, fucoidans were used for their intrinsic biological properties, for most of these studies they appear to have been used more for an ability to form stable structures with chitosan, as well as for pre-supposed harmlessness. Interestingly, physicochemical data for chitosan are often more detailed than for FF for which they are in general limited and sometimes even absent. Indeed, as evidenced in Table 3, in most cases the origin of FF is the only information provided, and, as a consequence, it is difficult to compare the results. Only three studies provide sufficient characteristics to the readers, and additional works are needed for discussion [158,176,191]. On one hand, this lack of structural data does not allow drugs to be created based on these polysaccharides [193]. On the other hand, the developments for Human health improvements require well-defined reproducible fucoidan fractions. If not, the conclusions are unique for a particular fraction, and, as a consequence, the results cannot be reproduced.

Fucoidans are polysaccharides, one of the three families of natural macromolecules with proteins and nucleic acids. Scientists have been able to fully synthesize the latter two for several decades. However the complexity of fucoidan structures has significantly delayed this essential step in their development to Human health, and overall progress in this domain suffers from a lack of tools such as those that are readily available for studying nucleic acids and proteins. More generally, once a particular carbohydrate structure has been identified as being responsible for a biological effect, it often has to be synthesized in order to establish or confirm its structure assignment. Nevertheless, dedicated synthesis methods are time-consuming, limited to oligosaccharides, and practiced mostly by specialized laboratories using processes that may take months to years because of the structural complexity of these compounds. As a consequence, despite the prevalent role of polysaccharides and oligosaccharides in a wide range of biological processes, it is not surprising that there are so few carbohydrate based therapeutics and diagnostics on the market. In addition to monosaccharide-inspired drugs such as the influenza virus treatment Tamiflu (oseltamivir phosphate; Roche, Bâle, Switzerland), two drugs: acarbose (Precose, Glucobay; Bayer, Leverkusen, Germany) and heparin, stand out [194]. Note that both compounds were derived by isolation and reached the clinic before a detailed structure–activity relationship had been established. In particular, low molecular weight heparin (LMWH) (lovenox; Sanofi, Gentilly, France), mainly extracted from pig intestines and fractionated via chromatography, chemical cleavage or enzymatic hydrolysis, is still the only polysaccharide used in Human health since its first clinical trial reported in the early 80's [195–198]. FF production follows the same process but the raw material is from vegetal origin, thereby preventing all contaminations attributed to animal products. However Health agencies have hardened the legislation about new pharmaceuticals in the last decade due to health scandals (in particular implicating LMWH in 2008 [199]), making FF more difficult to reach the market or even impossible without a reliable source. Anyway, scientists and companies who want to develop fucoidan-containing nanosystems up to clinical use must provide robust data about their product.

Nanomedicine approaches have revolutionized the treatment of human pathologies, in particular cancer and cardiovascular diseases [200,201]. Drugs are entrapped within sterically stabilized, long-circulating vehicles (therapeutics). Imaging markers such as radiolabels, USPIO or quantum dots allow real-time visualization of pathological areas (diagnostics). The theranostic strategy associates

both types in unique structures. These tailor-made nanosystems are built from polymers, carbon nanosheets, lipids, metal oxides etc., sometimes mixed to get hybrid structures, shaped as spheres, rods, capsules or more complicated geometry, and surface-modified to improve their efficacy and decrease side-toxicity. Ultimately they can be grafted with ligands to target cellular/molecular components of the diseases [200,201]. Bioactive carbohydrates, and in particular fucoidan fractions, are good candidates thanks to their overall biocompatibility, high versatility with regard to chemical modifications, and relatively low production costs. However the clinical development of fucoidan-based biospecific systems for nanomedicine remains a challenge because it requires not only a translational approach involving a partnership with pharmaceutical companies and respecting specifications approved by Health agencies [202] but also implementing a secure process to obtain reliable fractions.

In this context, we have considered a rational approach in order to develop a clinical contrast agent using FF (see [55,156,158,191]). From the pioneer works of Varki et al. [75], P-selectin was confirmed as a relevant molecular target of a commercial FF (Ascophyscient® from Algues & Mer, Ile d'Ouessant, France: a low molecular weight fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*). In 2013, a joint laboratory was created with the Algues & Mer Company to secure the production of reproducible FF with well-defined composition and molecular weight. In 2015, these fucoidans were labeled by the French authorities as "raw materials for pharmaceutical uses". Today, they are part of the European project Nanoathero for the development of a SPECT marker for human atherothrombosis [203] and clinical trials will start soon.

## 6. Conclusions

Fucoidans are abundant polysaccharides with remarkable biological properties. Their vegetal origins (considering that fucoidans extracted from marine animals are a tiny part of the total amount), the absence of adverse effects, and an affordable price due to easy-to-handle production processes make them promising for Human health. However these advantages are also the main bottlenecks for developments in nanomedicine due to the difficulty in obtaining reproducible chemical structures and molecular weights from one batch to another. Up to now, fucoidans in nanomedicine have been mainly used for protein or drug delivery with few studies about medical imaging; applications to regenerative medicine being still limited to bone tissue regeneration in animals. So far, isolation from natural sources is the only effective way to get fucoidans, but it is no longer possible to consider the molecular weight together with L-fucose and sulfate contents of a bioactive fraction as the only relevant parameters for further developments. The use of fucoidans in nanomedicine will be legitimated only by a translational strategy from a reproducible starting material with a defined and reproducible structure. This goal can be achieved only via two ways: (i) validation of an industrial production from natural extracts; or (ii) total synthesis with enzymes or chemical reactions. Currently, the first way is available; the second one is likely within the next decades [45]. The biomedical market represents an enormous opportunity for fucoidans, as their potential added value can, in principle, justify the inherent risk related with the development and approval of such products. Moreover, the possibility of developing a wide variety of chemically modified derivatives makes fucoidans versatile materials that could be applied in other fields of technological interest. This is a continuing challenge to polymer and biomaterial scientists, but it is already possible to anticipate that these strategic approaches will widen up perspectives and potential applications in the future.

**Acknowledgments:** This work was supported by Inserm and University Paris 13 and the competitiveness cluster Medicen Paris Region. P.S. is a recipient of the grant from University Paris 13 and IMOVA project founded by FUI/OSEO. L.C. is a recipient of a CIFRE grant from ANRT (ANR-13-RPIB-0006 "FucoThrombo"). The authors acknowledge the financial supports from FP7 NMP-LA-2012-309820 "NanoAthero", ANR-13-LAB1-0005-01 "FucoChem" and ANR-13-RPIB-0006 "FucoThrombo".

**Conflicts of Interest:** The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.



## References

1. Michel, G.; Tonon, T.; Scornet, D.; Cock, J.M.; Kloareg, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol.* **2010**, *188*, 82–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kloareg, B.; Quatrano, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol.* **1988**, *26*, 259–315.
3. Kylin, H. Zur Biochemie der Meeresalgen. *Z. Physiol. Chem.* **1913**, *83*, 171–197. [[CrossRef](#)]
4. Berteau, O.; Mulloy, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **2003**, *13*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Morya, V.K.; Kim, J.; Kim, E.K. Algal fucoidan: Structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 71–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Li, B.; Lu, F.; Wei, X.; Zhao, R. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules* **2008**, *13*, 1671–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Usov, A.I.; Bilan, M.I. Fucoidans—Sulfated polysaccharides of brown algae. *Russ. Chem. Rev.* **2009**, *78*, 785–799. [[CrossRef](#)]
8. Bilan, M.I.; Usov, A.I. Structural Analysis of Fucoidans. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1639–1648.
9. Ale, M.T.; Meyer, A.S. Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 8131–8141. [[CrossRef](#)]
10. Ustyuzhanina, N.E.; Bilan, M.I.; Ushakova, N.A.; Usov, A.I.; Kiselevskiy, M.V.; Nifantiev, N.E. Fucoidans: Pro- or antiangiogenic agents? *Glycobiology* **2014**, *24*, 1265–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Pomin, V.H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochem. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 1971–1979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ale, M.T.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2106–2130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vasseur, E.; Setälä, K.; Gjertsen, P. Chemical Studies on the Jelly Coat of the Sea-Urchin Egg. *Acta Chem. Scand.* **1948**, *2*, 900–913. [[CrossRef](#)]
14. Pomin, V.H. Fucanomics and Galactanomics: Marine Distribution, Medicinal Impact, Conceptions, and Challenges. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 793–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Deniaud-Bouë, E.; Kervarec, N.; Michel, G.; Tonon, T.; Kloareg, B.; Hervé, C. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: Insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Ann. Bot.* **2014**, *114*, 1203–1216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Alves, A.P.; Mulloy, B.; Diniz, J.A.; Mourao, P.A.S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 6965–6971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Vilela-Silva, A.-C.E.S.; Castro, M.O.; Valente, A.-P.; Biermann, C.H.; Mourão, P.A.S. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 379–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mourão, P.A.; Bastos, I.G. Highly acidic glycans from sea cucumbers. Isolation and fractionation of fucose-rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea*. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *166*, 639–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Conchie, J.; Percival, E.G.V. Fucoidin. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*. *J. Chem. Soc.* **1950**, 827–832. [[CrossRef](#)]
20. Patankar, M.S.; Oehninger, S.; Barnett, T.; Williams, R.L.; Clark, G.F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21770–21776. [[PubMed](#)]
21. Nishino, T.; Nishioka, C.; Ura, H.; Nagumo, T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydr. Res.* **1994**, *255*, 213–224. [[CrossRef](#)]
22. Chevlot, L.; Mulloy, B.; Ratiskol, J.; Foucault, A.; Collic-Jouault, S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr. Res.* **2001**, *330*, 529–535. [[CrossRef](#)]

23. Bilan, M.I.; Grachev, A.A.; Ustuzhanina, N.E.; Shashkov, A.S.; Nifantiev, N.E.; Usov, A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 719–730. [[CrossRef](#)]
24. Bilan, M.I.; Grachev, A.A.; Shashkov, A.S.; Kelly, M.; Sanderson, C.J.; Nifantiev, N.E.; Usov, A.I. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 2038–2047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sinurat, E.; Peranginangin, R.; Saepudin, E. Purification and Characterization of Fucoidan from the Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder. *Squalen Bull. Mar. Fish. Postharvest Biotechnol.* **2016**, *10*, 79–87. [[CrossRef](#)]
26. Luo, D.; Yuan, X.; Zeng, Y.; Nie, K.; Li, Z.; Wang, Z. Structure elucidation of a major fucopyranose-rich heteropolysaccharide (STP-II) from *Sargassum thunbergii*. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *143*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Usov, A.I.; Smirnova, G.P.; Bilan, M.I.; Shashkov, A.S. Polysaccharides of algae. 53. Brown alga *Laminaria saccharina* (L.) Lam. as a source of fucoidan. *Bioorg. Khim.* **1998**, *24*, 437–445.
28. Chizhov, A.O.; Dell, A.; Morris, H.R.; Haslam, S.M.; McDowell, R.A.; Shashkov, A.S.; Nifantiev, N.E.; Khatuntseva, E.A.; Usov, A.I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 108–119. [[CrossRef](#)]
29. Mulloy, B.; Ribeiro, A.C.; Alves, A.P.; Vieira, R.P.; Mourão, P.A. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0–2 and 0–4 positions. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22113–22123. [[PubMed](#)]
30. Vilela-Silva, A.-C.E.S.; Alves, A.-P.; Valente, A.-P.; Vacquier, V.D.; Mourao, P.A.S. 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* **1999**, *9*, 927–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Chevolut, L.; Foucault, A.; Chaubet, F.; Kervarec, N.; Sinquin, C.; Fisher, A.-M.; Boisson-Vidal, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 154–165. [[CrossRef](#)]
32. Yuan, Y.; Macquarrie, D.J. Microwave assisted step-by-step process for the production of fucoidan, alginate sodium, sugars and biochar from *Ascophyllum nodosum* through a biorefinery concept. *Bioresour. Technol.* **2015**, *198*, 819–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Larsen, B.; Haug, A.; Painter, T.J. Sulphated Polysaccharides in Brown Algae. I. Isolation and Preliminary Characterisation of Three Sulphated Polysaccharides from *Ascophyllum nodosum*. *Acta Chem. Scand.* **1966**, *20*, 219–230. [[CrossRef](#)]
34. Nardella, A.; Chaubet, F.; Boisson-Vidal, C.; Blondin, C.; Durand, P.; Jozefonvicz, J. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.* **1996**, *289*, 201–208. [[CrossRef](#)]
35. Kusaykin, M.; Bakunina, I.; Sova, V.; Ermakova, S.; Kuznetsova, T.; Besednova, N.; Zaporozhets, T.; Zvyagintseva, T. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnol. J.* **2008**, *3*, 904–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kim, W.J.; Park, J.W.; Park, J.K.; Choi, D.J.; Park, Y.I. Purification and Characterization of a Fucoidanase (FNase S) from a Marine Bacterium *Sphingomonas paucimobilis* PF-1. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4398–4417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Silchenko, A.S.; Kusaykin, M.I.; Kurilenko, V.V.; Zakharenko, A.M.; Isakov, V.V.; Zaporozhets, T.S.; Gazha, A.K.; Zvyagintseva, T.N. Hydrolysis of Fucoidan by Fucoidanase Isolated from the Marine Bacterium, *Formosa algae*. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2413–2430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Martin, M.; Barbeyron, T.; Martin, R.; Portetelle, D.; Michel, G.; Vandenbol, M. The Cultivable Surface Microbiota of the Brown Alga *Ascophyllum nodosum* is Enriched in Macroalgal-Polysaccharide-Degrading Bacteria. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Silchenko, A.S.; Khanh, H.H.N.; Hang, C.T.T.; Kurilenko, V.V.; Zakharenko, A.M.; Zueva, A.O.; Ly, B.M.; Kusaykin, M.I. A Simple Plate Method for the Screening and Detection of Fucoidanases. *Achiev. Life Sci.* **2015**, *9*, 104–106. [[CrossRef](#)]
40. Kim, H.-J.; Choi, J.-I.; Park, J.-G.; Song, B.-S.; Kim, J.-H.; Yoon, Y.; Kim, C.-J.; Shin, M.-H.; Byun, M.-W.; Lee, J.-W. Effects of Combined Treatment of Gamma Irradiation and Addition of Fucoidan/laminarin on Ready-to-eat Pork Patty. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2009**, *29*, 34–39. [[CrossRef](#)]



41. Choi, J.; Kim, H.-J. Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *97*, 358–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Choi, J.; Lee, S.G.; Han, S.J.; Cho, M.; Lee, P.C. Effect of gamma irradiation on the structure of fucoidan. *Radiat. Phys. Chem.* **2014**, *100*, 54–58. [[CrossRef](#)]
43. Silchenko, A.S.; Kusaykin, M.I.; Zakharenko, A.M.; Menshova, R.V.; Khanh, H.H.N.; Dmitrenok, P.S.; Isakov, V.V.; Zvyagintseva, T.N. Endo-1,4-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk *Lambis* sp. which producing sulphated fucooligosaccharides. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *102*, 154–160. [[CrossRef](#)]
44. Gerbst, A.G.; Grachev, A.A.; Ustyuzhanina, N.E.; Khatuntseva, E.A.; Tsvetkov, D.E.; Usov, A.I.; Shashkov, A.S.; Preobrazhenskaya, M.E.; Ushakova, N.A.; Nifantiev, N.E. The Synthesis and NMR and Conformational Studies of Fucoidan Fragments: VI. Fragments with an  $\alpha$ -(1→2)-Linked Fucobioside Unit. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2003**, *30*, 137–147. [[CrossRef](#)]
45. Krylov, V.B.; Kaskova, Z.M.; Vinnitskiy, D.Z.; Ustyuzhanina, N.E.; Grachev, A.A.; Chizhov, A.O.; Nifantiev, N.E. Acid-promoted synthesis of per-O-sulfated fucooligosaccharides related to fucoidan fragments. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 540–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hsu, C.H.; Hung, S.C.; Wu, C.Y.; Wong, C.H. Toward Automated Oligosaccharide Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11872–11923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Delattre, C.; Michaud, P.; Courtois, B.; Courtois, J. Oligosaccharides engineering from plants and algae. Applications in biotechnology and therapeutic. *Minerva Biotechnol.* **2005**, *17*, 107–117.
48. Nugent, M.A. Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10301–10303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lauder, R.M.; Huckerby, T.N.; Nieduszynski, I.A. A fingerprinting method for chondroitin/dermatan sulfate and hyaluronan oligosaccharides. *Glycobiology* **2000**, *10*, 393–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hricovini, M.; Guerrini, M.; Bisio, A. Structure of heparin-derived tetrasaccharide complexed to the plasma protein antithrombin derived from NOEs, J-couplings and chemical shifts. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261*, 789–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Pineo, G.F.; Hull, R.D. Low-molecular-weight heparin: Prophylaxis and treatment of venous thromboembolism. *Annu. Rev. Med.* **1997**, *48*, 79–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Liu, J.; Shriver, Z.; Pope, R.M.; Thorp, S.C.; Duncan, M.B.; Copeland, R.J.; Raska, C.S.; Yoshida, K.; Eisenberg, R.J.; Cohen, G.; et al. Characterization of a heparan sulfate octasaccharide that binds to herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33456–33467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ghatak, S.; Misra, S.; Toole, B.P. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38013–38020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. 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.; et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **2007**, *17*, 541–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bachelet, L.; Bertholon, I.; Lavigne, D.; Vassy, R.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Letourneur, D. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 141–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Blondin, C.; Fischer, E.; Boisson-Vidal, C.; Kazatchkine, M.D.; Jozefonvicz, J. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. *Mol. Immunol.* **1994**, *31*, 247–253. [[CrossRef](#)]
57. Springer, G.F.; Wurzel, H.A.; Mcneal, G.M.; Ansell, N.J.; Doughty, M.F. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol.* **1957**, *94*, 404–409. [[CrossRef](#)]
58. Zhao, X.; Guo, F.; Hu, J.; Zhang, L.; Xue, C.; Zhang, Z.; Li, B. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thromb. Res.* **2016**, *144*, 46–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Zaporozhets, T.; Besednova, N. Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: Review. *Pharm. Biol.* **2016**, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Tissot, B.; Daniel, R. Biological properties of sulfated fucans: The potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human complement system. *Glycobiology* **2003**, *13*, 29–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Wang, W.; Wang, S.-X.; Guan, H.-S. The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2795–2816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Schaeffer, D.J.; Krylov, V.S. Anti-HIV Activity of Extracts and Compounds from Algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, *45*, 208–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Vo, T.-S.; Kim, S.-K. Potential Anti-HIV Agents from Marine Resources: An Overview. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2871–2892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Harrop, H.A.; Rider, C.C.; Coombe, D.R. Sulphated polysaccharides exert anti-HIV activity at differing sites. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 163S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Dinesh, S.; Menon, T.; Hanna, L.E.; Suresh, V.; Sathuvan, M.; Manikannan, M. In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from *Sargassum swartzii*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *82*, 83–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Baba, M.; Snoeck, R.; Pauwels, R.; De Clercq, E. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1742–1745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. McClure, M.O.; Moore, J.P.; Blanc, D.F.; Scotting, P.; Cook, G.M.W.; Keynes, R.J.; Weber, J.N.; Davies, D.; Weiss, R.A. Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1992**, *8*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Ponce, N.M.A.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B.; Flores, M.L.; Stortz, C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: Extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 153–165. [[CrossRef](#)]
69. Kubes, P.; Jutila, M.; Payne, D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 2510–2519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Omata, M.; Matsui, N.; Inomata, N.; Ohno, T. Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1997**, *30*, 717–724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Granert, C.; Raud, J.; Waage, A.; Lindquist, L. Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 2071–2074. [[PubMed](#)]
72. Wu, G.J.; Shiu, S.M.; Hsieh, M.C.; Tsai, G.J. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaeifolium*. *Food Hydrocoll.* **2016**, *53*, 16–23. [[CrossRef](#)]
73. Lasky, L.A. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 113–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Wen, Z.S.; Xiang, X.W.; Jin, H.X.; Guo, X.Y.; Liu, L.J.; Huang, Y.N.; OuYang, X.K.; Qu, Y.L. Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *88*, 403–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Varki, A. Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7390–7397. [[CrossRef](#)]
76. Myers, S.P.; O'Connor, J.; Fitton, J.H.; Brooks, L.; Rolfe, M.; Connellan, P.; Wohlmuth, H.; Cheras, P.A.; Morris, C.A. A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis. *Biol. Targets Ther.* **2010**, *4*, 33–44. [[CrossRef](#)]
77. Liu, F.; Wang, J.; Chang, A.K.; Liu, B.; Yang, L.; Li, Q.; Wang, P.; Zou, X. Fucoidan extract derived from *Undaria pinnatifida* inhibits angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 797–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Koyanagi, S.; Tanigawa, N.; Nakagawa, H.; Soeda, S.; Shimeno, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 173–179. [[CrossRef](#)]
79. Soeda, S.; Kozako, T.; Iwata, K.; Shimeno, H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: Its possible mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2000**, *1497*, 127–134. [[CrossRef](#)]
80. Luyt, C.-E.; Meddahi-Pellé, A.; Ho-Tin-Noe, B.; Collic-Jouault, S.; Guezennec, J.; Louedec, L.; Prats, H.; Jacob, M.-P.; Osborne-Pellegrin, M.; Letourneur, D.; et al. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 24–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Purnama, A.; Aid-Launais, R.; Haddad, O.; Maire, M.; Mantovani, D.; Letourneur, D.; Hlawaty, H.; Le Visage, C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2015**, *5*, 187–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

82. Bouvard, C.; Galy-Fauroux, I.; Grelac, F.; Carpentier, W.; Lokajczyk, A.; Gandrille, S.; Collic-Jouault, S.; Fischer, A.M.; Helley, D. Low-Molecular-Weight Fucoidan Induces Endothelial Cell Migration via the PI3K/AKT Pathway and Modulates the Transcription of Genes Involved in Angiogenesis. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 7446–7462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Haddad, O.; Guyot, E.; Marival, N.; Chevalier, F.; Maillard, L.; Gadi, L.; Laguillier-Morizot, C.; Oudar, O.; Sutton, A.; Charnaux, N.; et al. Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 6588–6608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Chabut, D.; Fischer, A.M.; Collic-Jouault, S.; Laurendeau, I.; Matou, S.; Le Bonniec, B.; Helley, D. 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. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 696–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Matou, S.; Helley, D.; Chabut, D.; Bros, A.; Fischer, A.M. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res.* **2002**, *106*, 213–221. [[CrossRef](#)]
86. Giroux, J.-L.; Matou, S.; Bros, A.; Tapon-Bretonnière, J.; Letourneur, D.; Fischer, A.-M. Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin. *Eur. J. Cell Biol.* **1998**, *77*, 352–359. [[CrossRef](#)]
87. Boisson-Vidal, C.; Zemani, F.; Caligiuri, G.; Galy-Fauroux, I.; Collic-Jouault, S.; Helley, D.; Fischer, A.-M. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: Effect of fucoidan from marine algae. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2007**, *5*, 67–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Kwak, J.-Y. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 851–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Han, Y.S.; Lee, J.H.; Lee, S.H. Antitumor Effects of Fucoidan on Human Colon Cancer Cells via Activation of Akt Signaling. *Biomol. Ther.* **2015**, *23*, 225–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Atashrazm, F.; Lowenthal, R.M.; Woods, G.M.; Holloway, A.F.; Dickinson, J.L. Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 2327–2346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Jin, J.-O.; Song, M.-G.; Kim, Y.-N.; Park, J.-I.; Kwak, J.-Y. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: Involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. *Mol. Carcinog.* **2010**, *49*, 771–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Park, H.S.; Hwang, H.J.; Kim, G.-Y.; Cha, H.-J.; Kim, W.-J.; Kim, N.D.; Yoo, Y.H.; Choi, Y.H. Induction of apoptosis by fucoidan in human leukemia U937 cells through activation of p38 MAPK and modulation of Bcl-2 family. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2347–2364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Zhang, Z.; Teruya, K.; Yoshida, T.; Eto, H.; Shirahata, S. Fucoidan Extract Enhances the Anti-Cancer Activity of Chemotherapeutic Agents in MDA-MB-231 and MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 81–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Park, H.S.; Kim, G.-Y.; Nam, T.-J.; Kim, N.D.; Choi, Y.H. Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 77–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Boo, H.-J.; Hyun, J.-H.; Kim, S.-C.; Kang, J.-I.; Kim, M.-K.; Kim, S.-Y.; Cho, H.; Yoo, E.-S.; Kang, H.-K. Fucoidan from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 1082–1086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Boo, H.-J.; Hong, J.-Y.; Kim, S.-C.; Kang, J.-I.; Kim, M.-K.; Kim, E.-J.; Hyun, J.-W.; Koh, Y.-S.; Yoo, E.-S.; Kwon, J.-M.; et al. The anticancer effect of fucoidan in PC-3 prostate cancer cells. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2982–2999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Yang, L.; Wang, P.; Wang, H.; Li, Q.; Teng, H.; Liu, Z.; Yang, W.; Hou, L.; Zou, X. Fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 1961–1976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Shu, Z.; Shi, X.; Nie, D.; Guan, B. Low-Molecular-Weight Fucoidan Inhibits the Viability and Invasiveness and Triggers Apoptosis in IL-1beta-Treated Human Rheumatoid Arthritis Fibroblast Synoviocytes. *Inflammation* **2015**, *38*, 1777–1786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Chen, M.C.; Hsu, W.L.; Hwang, P.A.; Chou, T.C. Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4436–4451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



100. Wei, C.; Xiao, Q.; Kuang, X.; Zhang, T.; Yang, Z.; Wang, L. Fucoidan inhibits proliferation of the SKM-1 acute myeloid leukaemia cell line via the activation of apoptotic pathways and production of reactive oxygen species. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 6649–6655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Abu, R.; Jiang, Z.; Ueno, M.; Isaka, S.; Nakazono, S.; Okimura, T.; Cho, K.; Yamaguchi, K.; Kim, D.; Oda, T. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *458*, 727–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Cho, Y.; Yoon, J.H.; Yoo, J.J.; Lee, M.; Lee, D.H.; Cho, E.J.; Lee, J.H.; Yu, S.J.; Kim, Y.J.; Kim, C.Y. Fucoidan protects hepatocytes from apoptosis and inhibits invasion of hepatocellular carcinoma by up-regulating p42/44 MAPK-dependent NDRG-1/CAP43. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 544–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Li, J.; Chen, K.; Li, S.; Feng, J.; Liu, T.; Wang, F.; Zhang, R.; Xu, S.; Zhou, Y.; Zhou, S.; et al. Protective effect of fucoidan from *Fucus vesiculosus* on liver fibrosis via the TGF-beta1/Smad pathway-mediated inhibition of extracellular matrix and autophagy. *Drug Des. Dev. Ther.* **2016**, *10*, 619–630.
104. Ikeguchi, M.; Saito, H.; Miki, Y.; Kimura, T. Effect of Fucoidan Dietary Supplement on the Chemotherapy Treatment of Patients with Unresectable Advanced Gastric Cancer. *J. Cancer Ther.* **2015**, *6*, 1020–1026. [[CrossRef](#)]
105. Zhang, S.M.; Xie, Z.P.; Xu, M.L.; Shi, L.F. Cardioprotective effects of fucoidan against hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. *Pharm. Biol.* **2015**, *53*, 1352–1357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Shimizu, J.; Wada-Funada, U.; Mano, H.; Matahira, Y.; Kawaguchi, M.; Wada, M. Proportion of murine cytotoxic T cells is increased by high molecular weight fucoidan extracted from *Okinawa mozuku* (*Cladosiphon okamuranus*). *J. Health Sci.* **2005**, *51*, 394–397. [[CrossRef](#)]
107. Yang, C.; Chung, D.; Shina, I.-S.; Lee, H.; Kim, J.; Lee, Y.; You, S. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 433–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Azuma, K.; Ishihara, T.; Nakamoto, H.; Amaha, T.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Minami, S.; Takashima, O.; Ifuku, S.; et al. Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2337–2348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Cho, M.L.; Lee, B.Y.; You, S.G. Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their in vitro anticancer activity. *Molecules* **2010**, *16*, 291–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Akihiro, K.; Shinsuke, A.; Nozomi, K.; Daisuke, T.; Kazunobu, T. Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10556–10568.
111. Liu, B.; Kongstad, K.T.; Wiese, S.; Jäger, A.K.; Staerk, D. Edible seaweed as future functional food: Identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors by combined use of high-resolution  $\alpha$ -glucosidase inhibition profiling and HPLC–HRMS–SPE–NMR. *Food Chem.* **2016**, *203*, 16–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Lakshmana, S.S.; Vinoth, K.T.; Geetharamani, D.; Suja, G.; Yesudas, R.; Chacko, A. Fucoidan—An alpha-amylase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to NIDDM. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 644–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Kim, K.T.; Rioux, L.E.; Turgeon, S.L. Molecular weight and sulfate content modulate the inhibition of  $\alpha$ -amylase by fucoidan relevant for type 2 diabetes management. *PharmaNutrition* **2015**, *3*, 108–114. [[CrossRef](#)]
114. Chen, J.; Cui, W.; Zhang, Q.; Jia, Y.; Sun, Y.; Weng, L.; Luo, D.; Zhou, H.; Yang, L. Low molecular weight fucoidan ameliorates diabetic nephropathy via inhibiting epithelial-mesenchymal transition and fibrotic processes. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 1553–1563. [[PubMed](#)]
115. Heeba, G.H.; Morsy, M.A. Fucoidan ameliorates steatohepatitis and insulin resistance by suppressing oxidative stress and inflammatory cytokines in experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *40*, 907–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Shan, X.; Liu, X.; Hao, J.; Cai, C.; Fan, F.; Dun, Y.; Zhao, X.; Li, C.; Yu, G. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Wang, Y.; Wang, J.; Zhao, Y.; Hu, S.; Shi, D.; Xue, C. Fucoidan from sea cucumber *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects in insulin resistant mice via activating the PI3K/PKB pathway and GLUT4. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *121*, 36–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

118. Wang, J.; Hu, S.; Jiang, W.; Song, W.; Cai, L. Fucooidan from sea cucumber may improve hepatic inflammatory response and insulin resistance in mice. *Int. Immunopharm.* **2015**, *31*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Thelen, T.; Hao, Y.; Medeiros, A.I.; Curtis, J.L.; Serezani, C.H.; Kobzik, L.; Harris, L.H.; Aronoff, D.M. The class A scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure, is the major phagocytic receptor for *Clostridium sordellii* expressed by human decidual macrophages. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 4328–4335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Hu, Y.; Cheng, S.C.-S.; Chan, K.-T.; Ke, Y.; Xue, B.; Sin, F.W.-Y.; Zeng, C.; Xie, Y. Fucoidin enhances dendritic cell-mediated T-cell cytotoxicity against NY-ESO-1 expressing human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *392*, 329–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Yang, M.; Ma, C.; Sun, J.; Shao, Q.; Gao, W.; Zhang, Y.; Li, Z.; Xie, Q.; Dong, Z.; Qu, X. Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunopharm.* **2008**, *8*, 1754–1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Isnansetyo, A.; Fikriyah, A.; Kasanah, N. Non-specific immune potentiating activity of fucoidan from a tropical brown algae (Phaeophyceae), *Sargassum cristaeifolium* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Int.* **2016**, *24*, 465–477. [[CrossRef](#)]
123. Myers, S.P.; O'Connor, J.; Fitton, J.H.; Brooks, L.; Rolfe, M.; Connellan, P.; Wohlmuth, H.; Cheras, P.A.; Morris, C. A combined Phase I and II open-label study on the immunomodulatory effects of seaweed extract nutrient complex. *Biol. Targets Ther.* **2011**, *5*, 45–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Sharma, P. Cosmeceuticals: Regulatory scenario in US, Europe & India. *Int. J. Pharm. Technol.* **2012**, *3*, 1512–1535.
125. Rupérez, P.; Ahrazem, O.; Leal, J.A. Potential Antioxidant Capacity of Sulfated Polysaccharides from the Edible Marine Brown Seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 840–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. De Souza, M.C.R.; Marques, C.T.; Dore, C.M.G.; Da Silva, F.R.F.; Rocha, H.A.O.; Leite, E.L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **2007**, *19*, 153–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Costa, L.S.; Fidelis, G.P.; Telles, C.B.S.; Dantas-Santos, N.; Camara, R.B.G.; Cordeiro, S.L.; Costa, M.S.S.P.; Almeida-Lima, J.; Melo-Silveira, R.F.; Oliveira, R.M.; et al. Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 952–966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Wang, J.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Li, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *42*, 127–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Li, B.; Liu, S.; Xing, R.; Li, K.; Li, R.; Qin, Y.; Wang, X.; Wei, Z.; Li, P. Degradation of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1991–1996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Hou, Y.; Wang, J.; Jin, W.; Zhang, H.; Zhang, Q. Degradation of *Laminaria japonica* fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 153–159. [[CrossRef](#)]
131. Mak, W.; Hamid, N.; Liu, T.; Lu, J.; White, W.L. Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 606–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Hifney, A.F.; Fawzy, M.A.; Abdel-Gawad, K.M.; Gomaa, M. Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum* sp. and its potential antioxidant and emulsifying activities. *Food Hydrocoll.* **2016**, *54*, 77–88. [[CrossRef](#)]
133. Holdt, S.L.; Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 543–597. [[CrossRef](#)]
134. O'Doherty, J.V.; McDonnell, P.; Figat, S. The effect of dietary laminarin and fucoidan in the diet of the weanling piglet on performance and selected faecal microbial populations. *Livest. Sci.* **2010**, *134*, 208–210. [[CrossRef](#)]
135. Traifalgar, R.F.; Kira, H.; Tung, H.T.; Michael, F.R.; Laining, A.; Yokoyama, S.; Ishikawa, M.; Koshio, S.; Serrano, A.E.; Corre, V. Influence of Dietary Fucoidan Supplementation on Growth and Immunological Response of Juvenile *Marsupenaeus japonicus*. *J. World Aquac. Soc.* **2010**, *41*, 235–244. [[CrossRef](#)]
136. Lynch, M.B.; Sweeney, T.; Callan, J.J.; O'Sullivan, J.T.; O'Doherty, J.V. The effect of dietary Laminaria derived laminarin and fucoidan on intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. *Livest. Sci.* **2010**, *133*, 157–160. [[CrossRef](#)]

137. Walsh, A.M.; Sweeney, T.; O'Shea, C.J.; Doyle, D.N.; O'Doherty, J.V. Effect of supplementing varying inclusion levels of laminarin and fucoidan on growth performance, digestibility of diet components, selected faecal microbial populations and volatile fatty acid concentrations in weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2013**, *183*, 151–159. [[CrossRef](#)]
138. Zaporozhets, T.S.; Besednova, N.N.; Kuznetsova, T.A.; Zvyagintseva, T.N.; Makarenkova, I.D.; Kryzhanovsky, S.P.; Melnikov, V.G. The prebiotic potential of polysaccharides and extracts of seaweeds. *Russ. J. Mar. Biol.* **2014**, *40*, 1–9. [[CrossRef](#)]
139. Moroney, N.C.; O'Grady, M.N.; O'Doherty, J.V.; Kerry, J.P. Addition of seaweed (*Laminaria digitata*) extracts containing laminarin and fucoidan to porcine diets: Influence on the quality and shelf-life of fresh pork. *Meat Sci.* **2012**, *92*, 423–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Moroney, N.C.; O'Grady, M.N.; Lordan, S.; Stanton, C.; Kerry, J.P. Seaweed polysaccharides (laminarin and fucoidan) as functional ingredients in pork meat: An evaluation of anti-oxidative potential, thermal stability and bioaccessibility. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 2447–2464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Fitton, H.; Irhimeh, M.; Falk, N. Macroalgal fucoidan extracts: A new opportunity for marine cosmetics. *Cosmet. Toil.* **2007**, *122*, 55–64.
142. Hafner, A.; Lovric, J.; Lakos, G.P.; Pepic, I. Nanotherapeutics in the EU: An overview on current state and future directions. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 1005–1023.
143. Mura, S.; Couvreur, P. Nanotheranostics for personalized medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1394–1416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Bates, S. Progress towards personalized medicine. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 115–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Sadee, W.; Dai, Z. Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine. *Hum. Mol. Gen.* **2005**, *2*, 207–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Venkatesan, J.; Anil, S.; Kim, S.-K.; Shim, M. Seaweed Polysaccharide-Based Nanoparticles: Preparation and Applications for Drug Delivery. *Polymers* **2016**, *8*, 30. [[CrossRef](#)]
147. Cunha, L.; Grenha, A. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Silva, V.A.J.; Andrade, P.L.; Silva, M.P.C.; Bustamante, A.D.; De Los Santos Valladares, L.; Albino Aguiar, J. Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with fucan polysaccharides. *J. Magn. Magn. Mater.* **2013**, *343*, 138–143. [[CrossRef](#)]
149. Andrade, P.L.; Silva, V.A.J.; Silva, M.P.C.; Albino Aguiar, J. Synthesis and Characterization of Fucan-Coated Cobalt Ferrite Nanoparticles. *J. Supercond. Novel Magn.* **2012**, *26*, 2511–2514. [[CrossRef](#)]
150. Leung, T.C.-Y.W. C.K.; Xie, Y. Green synthesis of silver nanoparticles using biopolymers, carboxymethylated-curdlan and fucoidan. *Mater. Chem. Phys.* **2010**, *121*, 402–405. [[CrossRef](#)]
151. Nagarajan, S.; Kuppusamy, K.A. Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of gulf of Mannar, India. *J. Nanobiotechnol.* **2013**, *11*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Soisuwan, S.; Warisnoicharoen, W.; Lirdprapamongkol, K.; Svasti, J. Eco-friendly synthesis of fucoidan-stabilized gold nanoparticles. *Am. J. Appl. Sci.* **2010**, *7*, 1038–1042.
153. Lee, E.J.; Lim, K.H. Polyelectrolyte complexes of chitosan self-assembled with fucoidan: An optimum condition to prepare their nanoparticles and their characteristics. *Korean J. Chem. Eng.* **2014**, *31*, 664–675. [[CrossRef](#)]
154. Lee, E.J.; Lim, K.-H. Formation of chitosan-fucoidan nanoparticles and their electrostatic interactions: Quantitative analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, *121*, 73–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Ho, T.T. M.; Bremmell, K.E.; Krasowska, M.; Stringer, D.N.; Thierry, B.; Beattie, D.A. Tuning polyelectrolyte multilayer structure by exploiting natural variation in fucoidan chemistry. *Soft Matter* **2015**, *11*, 2110–2124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Bachelet-Violette, L.; Silva, A.K.A.; Maire, M.; Michel, A.; Brinza, O.; Ou, P.; Ollivier, V.; Nicoletti, A.; Wilhelm, C.; Letourneur, D.; et al. Strong and specific interaction of ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles and human activated platelets mediated by fucoidan coating. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 4864–4871. [[CrossRef](#)]
157. Bonnard, T.; Yang, G.; Petiet, A.; Ollivier, V.; Haddad, O.; Arnaud, D.; Louedec, L.; Bachelet-Violette, L.; Derkaoui, S.M.; Letourneur, D.; et al. Abdominal Aortic Aneurysms Targeted by Functionalized Polysaccharide Microparticles: A new Tool for SPECT Imaging. *Theranostics* **2014**, *4*, 592–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



158. Rouzet, F.; Bachelet-Violette, L.; Alsac, J.M.; Suzuki, M.; Meulemans, A.; Louedec, L.; Petiet, A.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Michel, J.B.; et al. Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1433–1440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Bonnard, T.; Serfaty, J.-M.; Journé, C.; Noe, B.H.T.; Arnaud, D.; Louedec, L.; Derkaoui, S.M.; Letourneur, D.; Chauvierre, C.; Le Visage, C. Leukocyte mimetic polysaccharide microparticles tracked in vivo on activated endothelium and in abdominal aortic aneurysm. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 3535–3545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Saboural, P.; Chaubet, F.; Rouzet, F.; Al-Shoukr, F.; Ben Azzouna, R.; Bouchemal, N.; Picton, L.; Louedec, L.; Maire, M.; Rolland, L.; et al. Purification of a Low Molecular Weight Fucoidan for SPECT Molecular Imaging of Myocardial Infarction. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4851–4867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Desbree, A.; Bonnard, T.; Blanchardon, E.; Petiet, A.; Franck, D.; Chauvierre, C.; Le Visage, C. Evaluation of Functionalized Polysaccharide Microparticles Dosimetry for SPECT Imaging Based on Biodistribution Data of Rats. *Mol. Imaging Biol.* **2015**, *17*, 504–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Li, X.; Bauer, W.; Israel, I.; Kreissl, M.C.; Weirather, J.; Richter, D.; Bauer, E.; Herold, V.; Jakob, P.; Buck, A.; et al. Targeting P-Selectin by Gallium-68-Labeled Fucoidan Positron Emission Tomography for Noninvasive Characterization of Vulnerable Plaques Correlation With In Vivo 17.6T MRI. *Arterioscler. Thromb. Biol.* **2014**, *34*, 1661–1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Sezer, A.D.; Akbuğa, J. Fucosphere—New microsphere carriers for peptide and protein delivery: Preparation and in vitro characterization. *J. Microencapsul.* **2006**, *23*, 513–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Nakamura, S.; Nambu, M.; Ishizuka, T.; Hattori, H.; Kanatani, Y.; Takase, B.; Kishimoto, S.; Amano, Y.; Aoki, H.; Kiyosawa, T.; et al. Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *J. Biomed. Mater. Res.* **2008**, *85*, 619–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Huang, Y.-C.; Yang, Y.-T. Effect of basic fibroblast growth factor released from chitosan-fucoidan nanoparticles on neurite extension. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**, *10*, 418–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Huang, Y.-C.; Liu, T.-J. Mobilization of mesenchymal stem cells by stromal cell-derived factor-1 released from chitosan/tripolyphosphate/fucoidan nanoparticles. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 1048–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Park, S.; Hwang, S.; Lee, J. pH-responsive hydrogels from moldable composite microparticles prepared by coaxial electro-spray drying. *Chem. Eng. J.* **2011**, *169*, 348–357. [[CrossRef](#)]
168. Yu, S.H.; Wu, S.J.; Wu, J.Y.; Wen, D.Y.; Mi, F.L. Preparation of fucoidan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *126*, 97–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Huang, Y.C.; Li, R.Y. Preparation and Characterization of Antioxidant Nanoparticles Composed of Chitosan and Fucoidan for Antibiotics Delivery. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4379–4398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Huang, Y.-C.; Lam, U.-I. Chitosan/fucoidan pH sensitive nanoparticles for oral delivery system. *J. Chin. Chem. Soc.* **2011**, *58*, 779–785. [[CrossRef](#)]
171. Lee, K.W.; Jeong, D.; Na, K. Doxorubicin loading fucoidan acetate nanoparticles for immune and chemotherapy in cancer treatment. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 850–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Kimura, R.; Rokkaku, T.; Takeda, S.; Senba, M.; Mori, N. Cytotoxic effects of fucoidan nanoparticles against osteosarcoma. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4267–4278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Yu, S.H.; Tang, D.W.; Hsieh, H.Y.; Wu, W.S.; Lin, B.X.; Chuang, E.Y.; Sung, H.W.; Mi, F.L. Nanoparticle-induced tight-junction opening for the transport of an anti-angiogenic sulfated polysaccharide across Caco-2 cell monolayers. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 7449–7459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Huang, Y.C.; Kuo, T.H. O-carboxymethyl chitosan/fucoidan nanoparticles increase cellular curcumin uptake. *Food Hydrocoll.* **2016**, *53*, 261–269. [[CrossRef](#)]
175. Wu, S.J.; Don, T.M.; Lin, C.W.; Mi, F.L. Delivery of Berberine Using Chitosan/Fucoidan-Taurine Conjugate Nanoparticles for Treatment of Defective Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5677–5697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Pinheiro, A.C.; Bourbon, A.I.; Cerqueira, M.A.; Maricato, E.; Nunes, C.; Coimbra, M.A.; Vicente, A.A. Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *115*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Yeh, T.-H.; Hsu, L.-W.; Tseng, M.T.; Lee, P.-L.; Sonjae, K.; Ho, Y.-C.; Sung, H.-W. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6164–6173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

178. Da Silva, L.C.G.T.; Mori, M.; Sandri, G.; Bonferoni, M.C.; Finotelli, P.V.; Cinelli, L.P.; Caramella, C.; Cabral, L.M. Preparation and characterization of polysaccharide-based nanoparticles with anticoagulant activity. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 2975–2986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Sezer, A.D.; Akbuğa, J. Comparison on in vitro characterization of fucospheres and chitosan microspheres encapsulated plasmid DNA (pGM-CSF): Formulation design and release characteristics. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 1193–1199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Kurosaki, T.; Kitahara, T.; Kawakami, S.; Nishida, K.; Nakamura, J.; Teshima, M.; Nakagawa, H.; Kodama, Y.; To, H.; Sasaki, H. The development of a gene vector electrostatically assembled with a polysaccharide capsule. *Biomaterials* **2009**, *30*, 4427–4434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Kim, S.K. Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 300–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Jeong, H.S.; Venkatesan, J.; Kim, S.K. Hydroxyapatite-fucoidan nanocomposites for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *57*, 138–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Lowe, B.; Venkatesan, J.; Anil, S.; Shim, M.S.; Kim, S.K. Preparation and characterization of chitosan-natural nano hydroxyapatite-fucoidan nanocomposites for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Puvaneswary, S.; Talebian, S.; Raghavendran, H.B.; Murali, M.R.; Mehrali, M.; Afifi, A.M.; Kasim, N.H.; Kamarul, T. Fabrication and in vitro biological activity of betaTCP-Chitosan-Fucoidan composite for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *134*, 799–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Changotade, S.I.; Korb, G.; Bassil, J.; Barroukh, B.; Willig, C.; Collic-Jouault, S.; Durand, P.; Godeau, G.; Senni, K. Potential effects of a low-molecular-weight fucoidan extracted from brown algae on bone biomaterial osteoconductive properties. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *87*, 666–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Jin, G.; Kim, G.H. Rapid-prototyped PCL/fucoidan composite scaffolds for bone tissue regeneration: Design, fabrication, and physical/biological properties. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 17710–17718. [[CrossRef](#)]
187. Lee, J.S.; Jin, G.H.; Yeo, M.G.; Jang, C.H.; Lee, H.; Kim, G.H. Fabrication of electrospun biocomposites comprising polycaprolactone/fucoidan for tissue regeneration. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 181–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Lira, M.C.; Santos-Magalhaes, N.S.; Nicolas, V.; Marsaud, V.; Silva, M.P.; Ponchel, G.; Vauthier, C. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79*, 162–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Sezer, A.D.; Cevher, E.; Hatipoğlu, F.; Oğurtan, Z.; Baş, A.L.; Akbuğa, J. The use of fucosphere in the treatment of dermal burns in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69*, 189–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Sezer, A.D.; Cevher, E.; Hatipoglu, F.; Oğurtan, Z.; Bas, A.L.; Akbuga, J. Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 2326–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Suzuki, M.; Bachelet-Violette, L.; Rouzet, F.; Beilvert, A.; Autret, G.; Maire, M.; Menager, C.; Louedec, L.; Choqueux, C.; Saboural, P.; et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 73–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Senni, K.; Pereira, J.; Gueniche, F.; Delbarre-Ladrat, C.; Siquin, C.; Ratiskol, J.; Godeau, G.; Fischer, A.M.; Helley, D.; Collic-Jouault, S. Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1664–1681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Ermakova, S.; Kusaykin, M.; Trincone, A.; Tatiana, Z. Are multifunctional marine polysaccharides a myth or reality? *Front. Chem.* **2015**, *3*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Seeberger, P.H.; Werz, D.B. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. *Nature* **2007**, *446*, 1046–1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Linhardt, R.J.; Gunay, N.S. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Semin. Thromb. Hemost.* **1999**, *25*, 5–16. [[PubMed](#)]
196. Chavarroche, A.A.; van den Broek, L.A.; Eggink, G. Production methods for heparosan, a precursor of heparin and heparan sulfate. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93*, 38–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Gray, E.; Mulloy, B.; Barrowcliffe, T.W. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb. Haemost.* **2008**, *99*, 807–818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Kakkar, V.V.; Djazaeri, B.; Fok, J.; Fletcher, M.; Scully, M.F.; Westwick, J. Low-molecular-weight heparin and prevention of postoperative deep vein thrombosis. *Br. Med. J.* **1982**, *284*, 375–379. [[CrossRef](#)]



199. Liu, H.; Zhang, Z.; Linhardt, R.J. Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 313–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Doshi, N.; Mitragotri, S. Designer Biomaterials for Nanomedicine. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3843–3854. [[CrossRef](#)]
201. Gupta, A.S. Nanomedicine approaches in vascular disease: A review. *Nanomedicine* **2011**, *7*, 763–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Sainz, V.; Connot, J.; Matos, A.I.; Peres, C.; Zupancic, E.; Moura, L.; Silva, L.C.; Florindo, H.F.; Gaspar, R.S. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2015**, *468*, 504–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Chauvierre, C.; Letourneur, D. The European project NanoAthero to fight cardiovascular diseases using nanotechnologies. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 3391–3400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Références

---

1. Giraux, J.-L. M., S.; Bros, A.; Tapon-Bretonnière, J.; Letourneur, D.; Fischer, A.-M., Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin. *Eur. J. Cell Biol.* **1998**, *77*, 352–359.
2. Chabut, D. F., A. M.; Collic-Jouault, S.; Laurendeau, I.; Matou, S.; Le Bonniec, B.; Helley, D., 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. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 696–702.
3. Bachelet, L.; Bertholon, I.; Lavigne, D.; Vassy, R.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Letourneur, D., Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochimica et biophysica acta* **2009**, *1790*, (2), 141-146.
4. Hafner, A.; Lovric, J.; Lakos, G. P.; Pepic, I., Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *International journal of nanomedicine* **2014**, *9*, 1005-1023.
5. Mura, S.; Couvreur, P., Nanotheranostics for personalized medicine. *Advanced drug delivery reviews* **2012**, *64*, (13), 1394-1416.
6. Bates, S., Progress towards personalized medicine. *Drug discovery today* **2010**, *15*, (3-4), 115-120.
7. Sadee, W.; Dai, Z., Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine. *Human molecular genetics* **2005**, *2*, 207-214.
8. Michel, G.; Tonon, T.; Scornet, D.; Cock, J. M.; Kloareg, B., The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol* **2010**, *188*, (1), 82-97.
9. Kloareg, B.; Quatrano, R. S., Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol.* **1988**, *26*, 259 - 315.
10. Kylin, H., Zur Biochemie der Meeresalgen. *Z. Physiol. Chem.* **1913**, *83*, 171-197.
11. Berteau, O.; Mulloy, B., Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **2003**, *13*, (6), 29-40.
12. Morya, V. K.; Kim, J.; Kim, E. K., Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **2012**, *93*, 71-82.
13. Li, B.; Lu, F.; Wei, X.; Zhao, R., Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules* **2008**, *13*, (8), 1671-1695.
14. Usov, A. I.; Bilan, M. I., Fucoidans - Sulfated polysaccharides of brown algae. *Russ. Chem. Rev.* **2009**, *78*, (8), 785 - 799.
15. Bilan, M. I.; Usov, A. I., Structural Analysis of Fucoidans. *Nat. Prod. Commun* **2008**, *3*, 1639 - 1648.

16. Ale, M. T.; Meyer, A. S., Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Adv.* **2013**, 3, (22), 8131-8141.
17. Ustyuzhanina, N. E.; Bilan, M. I.; Ushakova, N. A.; Usov, A. I.; Kiselevskiy, M. V.; Nifantiev, N. E., Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents? *Glycobiology* **2014**, 24, (12), 1265-1274.
18. Pomin, V. H., Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochem. Biophys. Acta* **2012**, 1820, 1971–1979.
19. Ale, M. T.; Mikkelsen, J. D.; Meyer, A. S., Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar. Drugs* **2011**, 9, (10), 2106-30.
20. Vasseur, E.; Setälä, K.; Gjertsen, P., Chemical Studies on the Jelly Coat of the Sea-Urchin Egg. *Acta Chem. Scand.* **1948**, 2, 900-913.
21. Pomin, V. H., Fucanomics and Galactanomics: Marine Distribution, Medicinal Impact, Conceptions, and Challenges. *Mar. Drugs* **2012**, 10, 793–811.
22. Fletcher, H. R.; Biller, P.; Ross, A. B.; Adams, J. M. M., The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal Research* **2017**, 22, 79-86.
23. Skriptsova, A. V., Seasonal variations in the fucoidan content of brown algae from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russ. J. Mar. Biol.* **2016**, 42, (4), 351-356.
24. Deniaud-Boue, E.; Kervarec, N.; Michel, G.; Tonon, T.; Kloareg, B.; Hervé, C., Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Ann. Bot.* **2014**, 114, 1203–1216.
25. Alves, A. P.; Mulloy, B.; Diniz, J. A.; Mourao, P. A. S., Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 6965–6971.
26. Vilela-Silva, A.-C. E. S.; Castro, M. O.; Valente, A.-P.; Biermann, C. H.; Mourão, P. A. S., Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 379–387.
27. Mourão, P. A.; Bastos, I. G., Highly acidic glycans from sea cucumbers. Isolation and fractionation of fucose-rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea*. *Eur. J. Biochem.* **1987**, 166, 639–645.
28. Conchie, J.; Percival, E. G. V., Fucoidin. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*. *J. Chem. Soc.* **1950**, 827–832.
29. Patankar, M. S.; Oehninger, S.; Barnett, T.; Williams, R. L.; Clark, G. F., A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 21770–21776.
30. Nishino, T.; Nishioka, C.; Ura, H.; Nagumo, T., Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from

- commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydr. Res.* **1994**, 255, 213–224.
31. Chevlot, L.; Mulloy, B.; Ratiskol, J.; Foucault, A.; Collic-Jouault, S., A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr. Res.* **2001**, 330, 529–535.
  32. Bilan, M. I.; Grachev, A. A.; Ustuzhanina, N. E.; Shashkov, A. S.; Nifantiev, N. E.; Usov, A. I., Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 719–730.
  33. Bilan, M. I.; Grachev, A. A.; Shashkov, A. S.; Kelly, M.; Sanderson, C. J.; Nifantiev, N. E.; Usov, A. I., Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. *Carbohydr. Res.* **2010**, 345, (14), 2038-47.
  34. Sinurat, E.; Peranginangin, R.; Saepudin, E., Purification and Characterization of Fucoidan from the Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder. *Squalen Bull. Mar. Fish. Postharvest Biotechnol.* **2016**, 10, (2), 79-87.
  35. Luo, D.; Yuan, X.; Zeng, Y.; Nie, K.; Li, Z.; Wang, Z., Structure elucidation of a major fucopyranose-rich heteropolysaccharide (STP-II) from *Sargassum thunbergii*. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 143, 1-8.
  36. Usov, A. I.; Smirnova, G. P.; Bilan, M. I.; Shashkov, A. S., Polysaccharides of algae. 53. Brown alga *Laminaria saccharina* (L.) Lam. as a source of fucoidan. *Bioorg. Khim.* **1998**, 24, 437–445.
  37. Chizhov, A. O.; Dell, A.; Morris, H. R.; Haslam, S. M.; McDowell, R. A.; Shashkov, A. S.; Nifantiev, N. E.; Khatuntseva, E. A.; Usov, A. I., A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr. Res.* **1999**, 320, 108–119.
  38. Mulloy, B.; Ribeiro, A. C.; Alves, A. P.; Vieira, R. P.; Mourão, P. A., Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 22113–22123.
  39. Vilela-Silva, A.-C. E. S.; Alves, A.-P.; Valente, A.-P.; Vacquier, V. D.; Mourao, P. A. S., 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* **1999**, 9, 927–933.
  40. Chevlot, L.; Foucault, A.; Chaubet, F.; Kervarec, N.; Siquin, C.; Fisher, A.-M.; Boisson-Vidal, C., Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* **1999**, 319, 154–165.
  41. Yuan, Y.; Macquarrie, D. J., Microwave assisted step-by-step process for the production of fucoidan, alginate sodium, sugars and biochar from *Ascophyllum nodosum* through a biorefinery concept. *Bioresource technology* **2015**, 198, 819-827.
  42. Tsubaki, S.; Oono, K.; Hiraoka, M.; Onda, A.; Mitani, T., Microwave-assisted hydrothermal extraction of sulfated polysaccharides from *Ulva* spp. and *Monostroma latissimum*. *Food Chem.* **2016**, 210, 311-316.
  43. Charoensiddhi, S.; Lorbeer, A. J.; Lahnstein, J.; Bulone, V.; Franco, C. M. M.; Zhang, W., Enzyme-assisted extraction of carbohydrates from the

- brown alga *Ecklonia radiata* : Effect of enzyme type, pH and buffer on sugar yield and molecular weight profiles. *Process Biochem.* **2016**, 51, (10), 1503-1510.
44. Flórez-Fernández, N.; López-García, M.; González-Muñoz, M. J.; Vilariño, J. M. L.; Domínguez, H., Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum*. *J. Appl. Phycol.* **2017**, 29, (3), 1553-1561.
  45. Larsen, B.; Haug, A.; Painter, T. J., Sulphated Polysaccharides in Brown Algae. I. Isolation and Preliminary Characterisation of Three Sulphated Polysaccharides from *Ascophyllum nodosum*. *Acta Chem. Scand.* **1966**, 20, 219-230.
  46. Hsu, C.-H.; Hung, S.-C.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H., Toward Automated Oligosaccharide Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, (50), 11872-11923.
  47. Hwang, P.-A.; Yan, M.-D.; Kuo, K.-L.; Phan, N. N.; Lin, Y.-C., A mechanism of low molecular weight fucoidans degraded by enzymatic and acidic hydrolysis for the prevention of UVB damage. *J. Appl. Phycol.* **2016**, 29, (1), 521-529.
  48. Nardella, A.; Chaubet, F.; Boisson-Vidal, C.; Blondin, C.; Durand, P.; Jozefonvicz, J., Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.* **1996**, 289, 201–208.
  49. Kusaykin, M.; Bakunina, I.; Sova, V.; Ermakova, S.; Kuznetsova, T.; Besednova, N.; Zaporozhets, T.; Zvyagintseva, T., Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnology journal* **2008**, 3, (7), 904-915.
  50. Kim, W. J.; Park, J. W.; Park, J. K.; Choi, D. J.; Park, Y. I., Purification and Characterization of a Fucoidanase (FNase S) from a Marine Bacterium *Sphingomonas paucimobilis* PF-1. *Mar. Drugs* **2015**, 13, (7), 4398-4417.
  51. Silchenko, A. S.; Kusaykin, M. I.; Kurilenko, V. V.; Zakharenko, A. M.; Isakov, V. V.; Zaporozhets, T. S.; K., G. A.; Zvyagintseva, T. N., Hydrolysis of Fucoidan by Fucoidanase Isolated from the Marine Bacterium, *Formosa algae*. *Mar. Drugs* **2013**, 11, 2413-2430.
  52. Martin, M.; Barbeyron, T.; Martin, R.; Portetelle, D.; Michel, G.; Vandenbol, M., The Cultivable Surface Microbiota of the Brown Alga *Ascophyllum nodosum* is Enriched in Macroalgal-Polysaccharide-Degrading Bacteria. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 1487.
  53. Silchenko, A. S.; Khanh, H. H. N.; Hang, C. T. T.; Kurilenko, V. V.; Zakharenko, A. M.; Zueva, A. O.; Ly, B. M.; Kusaykin, M. I., A Simple Plate Method for the Screening and Detection of Fucoidanases. *Achiev. Life Sci.* **2015**, 9, (2), 104-106.
  54. Nagao, T.; Kumabe, A.; Komatsu, F.; Yagi, H.; Suzuki, H.; Ohshiro, T., Gene identification and characterization of fucoidan deacetylase for potential application to fucoidan degradation and diversification. *J. Biosci. Bioeng.* **2017**.
  55. Kim, H.-J.; Choi, J.-I.; Park, J.-G.; Song, B.-S.; Kim, J.-H.; Yoon, Y.; Kim, C.-J.; Shin, M.-H.; Byun, M.-W.; Lee, J.-W., Effects of Combined Treatment

- of Gamma Irradiation and Addition of Fucoidan/laminarin on Ready-to-eat Pork Patty. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2009**, 29, 34–39.
56. Choi, J. K., H.-J., Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 97, 358–362.
57. Choi, J.; Gu Lee, S.; Jong Han, S.; Cho, M.; Cheon Lee, P., Effect of gamma irradiation on the structure of fucoidan. *Radiat. Phys. Chem.* **2014**, 100, 54–58.
58. Silchenko, A. S.; Kusaykin, M. I.; Zakharenko, A. M.; Menshova, R. V.; Khanh, H. H. N.; Dmitrenok, P. S.; Isakov, V. V.; Zvyagintseva, T. N., Endo-1,4-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk *Lambis* sp. which producing sulphated fucooligosaccharides. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, 102, 154-160.
59. A. G. Gerbst, A. A. G., N. E. Ustyuzhanina, E. A. Khatuntseva, D. E. Tsvetkov, A. I. Usov, A. S. Shashkov, M. E. Preobrazhenskaya, N. A. Ushakova and N. E. Nifantiev, The Synthesis and NMR and conformational Studies of Fucoidan Fragments: VI. Fragments with an  $\alpha$ -(1->2)-Linked Fucobioside Unit. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2003**, 30, (2), 137-147.
60. Krylov, V. B.; Kaskova, Z. M.; Vinnitskiy, D. Z.; Ustyuzhanina, N. E.; Grachev, A. A.; Chizhov, A. O.; Nifantiev, N. E., Acid-promoted synthesis of per-O-sulfated fucooligosaccharides related to fucoidan fragments. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, (5), 540-550.
61. Wu, Y.; Xiong, D. C.; Chen, S. C.; Wang, Y. S.; Ye, X. S., Total synthesis of mycobacterial arabinogalactan containing 92 monosaccharide units. *Nat. Commun.* **2017**, 8, 14851.
62. Delattre, C.; Michaud, P.; Courtois, B.; Courtois, J., Oligosaccharides engineering from plants and algae. Applications in biotechnology and therapeutic. *Minerva Biotechnol.* **2005**, 17, 107-117.
63. Nugent, M. A., Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10301-10303.
64. Lauder, R. M.; Huckerby, T. N.; Nieduszynski, I. A., A fingerprinting method for chondroitin/dermatan sulfate and hyaluronan oligosaccharides. *Glycobiology* **2000**, 10, 393-401.
65. Hricovini, M.; Guerrini, M.; Bisio, A., Structure of heparin-derived tetrasaccharide complexed to the plasma protein antithrombin derived from NOEs, J-couplings and chemical shifts. *Eur. J. Biochem.* **1999**, 261, 789-801.
66. Blondin, C. F., E.; Boisson-Vidal, C.; Kazatchkine, M. D.; Jozefonvicz, J., Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. *Mol. Immunol.* **1994**, 31, 247–253.
67. Springer, G. F. W., H. A.; Mcneal, G. M.; Ansell, N. J.; Doughty, M. F., Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol* **1957**, 94, 404–409.
68. Zhao, X.; Guo, F.; Hu, J.; Zhang, L.; Xue, C.; Zhang, Z.; Li, B., Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thromb. Res.* **2016**, 144, 46-52.

69. Zaporozhets, T.; Besednova, N., Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: Review. *Pharm. Biol.* **2016**, 1-10.
70. Ou, M.; Sun, X.; Liang, J.; Liu, F.; Wang, L.; Wu, X.; Tu, J., A polysaccharide from *Sargassum thunbergii* inhibits angiogenesis via downregulating MMP-2 activity and VEGF/HIF-1 $\alpha$  signaling. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 94, 451-458.
71. Marinval, N.; Saboural, P.; Haddad, O.; Maire, M.; Bassand, K.; Geinguenaud, F.; Djaker, N.; Ben Akrouf, K.; Lamy de la Chapelle, M.; Robert, R.; Oudar, O.; Guyot, E.; Laguillier-Morizot, C.; Sutton, A.; Chauvierre, C.; Chaubet, F.; Charnaux, N.; Hlawaty, H., Identification of a Pro-Angiogenic Potential and Cellular Uptake Mechanism of a LMW Highly Sulfated Fraction of Fucoidan from *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Drugs* **2016**, 14, (185).
72. 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., A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **2007**, 17, (5), 541-552.
73. Ozaltin, K.; Lehocky, M.; Humpolicek, P.; Pelkova, J.; Saha, P., A New Route of Fucoidan Immobilization on Low Density Polyethylene and Its Blood Compatibility and Anticoagulation Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, (908).
74. Tissot, B.; Daniel, R., Biological properties of sulfated fucans: the potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human complement system. *Glycobiology* **2003**, 13, 29–30.
75. Wang, W. W., S.-X.; Guan, H.-S., The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview. *Mar. Drugs* **2012**, 10, 2795–2816.
76. Schaeffer, D. J. K., V. S., Anti-HIV Activity of Extracts and Compounds from Algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, 45, 208–227.
77. Vo, T.-S. K., S.-K., Potential Anti-HIV Agents from Marine Resources: An Overview. *Mar. Drugs* **2010**, 8, 2871–2892.
78. Harrop, H. A. R., C. C.; Coombe, D. R., Sulphated polysaccharides exert anti-HIV activity at differing sites. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, 20, 163S.
79. Dinesh, S.; Menon, T.; Hanna, L. E.; Suresh, V.; Sathuvan, M.; Manikannan, M., In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from *Sargassum swartzii*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 82, 83-88.
80. Baba, M. S., R.; Pauwels, R.; de Clercq, E., Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, 32, 1742–1745.
81. McClure, M. O. M., J. P.; Blanc, D. F.; Scotting, P.; Cook, G. M. W.; Keynes, R. J.; Weber, J. N.; Davies, D.; Weiss, R. A., Investigations into the



- mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1992**, 8, 19–26.
82. Ponce, N. M. A. P., C. A.; Damonte, E. B.; Flores, M. L.; Stortz, C. A. , Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 153–165.
83. Wang, W.; Wu, J.; Zhang, X.; Hao, C.; Zhao, X.; Jiao, G.; Shan, X.; Tai, W.; Yu, G., Inhibition of Influenza A Virus Infection by Fucoidan Targeting Viral Neuraminidase and Cellular EGFR Pathway. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 40760.
84. Cumashi, A. U., 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., A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **2007**, 17, 541–552.
85. Kubes, P. J., M.; Payne, D., Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J. Clin. Invest.* **1995**, 95, 2510–2519.
86. Omata, M. M., N.; Inomata, N.; Ohno, T., Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1997**, 30, 717–724.
87. Granert, C. R., J.; Waage, A.; Lindquist, L., Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit. *Infect. Immun.* **1999**, 67, 2071–2074.
88. Wu, G.-J.; Shiu, S.-M.; Hsieh, M.-C.; Tsai, G.-J., Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaeifolium*. *Food Hydrocoll.* **2016**, 53, 16-23.
89. Lasky, L. A., Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 113–139.
90. Wen, Z. S.; Xiang, X. W.; Jin, H. X.; Guo, X. Y.; Liu, L. J.; Huang, Y. N.; OuYang, X. K.; Qu, Y. L., Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 88, 403-416.
91. Varki, A., Selectin ligands. *Proc. Nati. Acad. Sci* **1994**, 91, 7390-7397.
92. Myers, S. P. O. C., J.; Fitton, J. H.; Brooks, L.; Rolfe, M.; Connellan, P.; Wohlmuth, H.; Cheras, P. A.; Morris, C., A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis. *Biol. Targets Ther.* **2010**, 4, 33–44.
93. Takahashi, H.; Kawaguchi, M.; Kitamura, K.; Narumiya, S.; Kawamura, M.; Tengan, I.; Nishimoto, S.; Hanamura, Y.; Majima, Y.; Tsubura, S.; Teruya, K.; Shirahata, S., An Exploratory Study on the Anti-inflammatory Effects of Fucoidan in Relation to Quality of Life in Advanced Cancer Patients. *Integr. Cancer Ther.* **2017**.
94. Nguyen, V. T.; Ko, S. C.; Oh, G. W.; Heo, S. Y.; Jeon, Y. J.; Park, W. S.; Choi, I. W.; Choi, S. W.; Jung, W. K., Anti-inflammatory effects of sodium

- alginate/gelatine porous scaffolds merged with fucoidan in murine microglial BV2 cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 93, 1620-1632.
95. Park, J.; Cha, J. D.; Choi, K. M.; Lee, K. Y.; Han, K. M.; Jang, Y. S., Fucoidan inhibits LPS-induced inflammation in vitro and during the acute response in vivo. *International immunopharmacology* **2017**, 43, 91-98.
  96. Hwang, P. A.; Phan, N. N.; Lu, W. J.; Ngoc Hieu, B. T.; Lin, Y. C., Low-molecular-weight fucoidan and high-stability fucoxanthin from brown seaweed exert prebiotics and anti-inflammatory activities in Caco-2 cells. *Food Nutr. Res.* **2016**, 60, 32033.
  97. Xu, Y.; Zhang, Q.; Luo, D.; Wang, J.; Duan, D., Low molecular weight fucoidan ameliorates the inflammation and glomerular filtration function of diabetic nephropathy. *J. Appl. Phycol.* **2016**, 29, (1), 531-542.
  98. Xin Wang, L. P., Haibo Liu, Kai Qv, Weiwei Xian, Jia Liu, Guomin Zhang, Fucoidan attenuates atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> mice through inhibition of inflammation and oxidative stress. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2016**, 9, (7), 6896-6904.
  99. Liu, F. W., J.; Chang, A. K.; Liu, B.; Yang, L.; Li, Q.; Wang, P.; Zou, X., Fucoidan extract derived from *Undaria pinnatifida* inhibits angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells. *Phytomedicine* **2012**, 19, 797–803.
  100. Koyanagi, S. T., N.; Nakagawa, H.; Soeda, S.; Shimeno, H., Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 173–179.
  101. Soeda, S.; Kozako, T.; Iwata, K.; Shimeno, H., Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2000**, 1497, 127–134.
  102. Luyt, C.-E. M.-P., A.; Ho-Tin-Noe, B.; Colliec-Jouault, S.; Guezennec, J.; Louedec, L.; Prats, H.; Jacob, M.-P.; Osborne-Pellegrin, M.; Letourneur, D.; Michel, J.-B., Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 305, 24–30.
  103. Purnama, A. A.-L., R.; Haddad, O.; Maire, M.; Mantovani, D.; Letourneur, D.; Hlawaty, H.; Le Visage, C. , Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2015**, 5, 187-197.
  104. Bouvard, C.; Galy-Fauroux, I.; Grelac, F.; Carpentier, W.; Lokajczyk, A.; Gandrille, S.; Colliec-Jouault, S.; Fischer, A. M.; Helley, D., Low-Molecular-Weight Fucoidan Induces Endothelial Cell Migration via the PI3K/AKT Pathway and Modulates the Transcription of Genes Involved in Angiogenesis. *Mar. Drugs* **2015**, 13, (12), 7446-7462.
  105. Haddad, O.; Guyot, E.; Marival, N.; Chevalier, F.; Maillard, L.; Gadi, L.; Laguillier-Morizot, C.; Oudar, O.; Sutton, A.; Charnaux, N.; Hlawaty, H., Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Mar. Drugs* **2015**, 13, (11), 6588-6608.
  106. Matou, S. H., D.; Chabut, D.; Bros, A.; Fischer, A. M., Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res.* **2002**, 106, 213–221.

107. Boisson-Vidal, C. Z., F.; Caligiuri, G.; Galy-Fauroux, I.; Collic-Jouault, S.; Helley, D.; Fischer, A.-M., Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: effect of fucoidan from marine algae. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2007**, *5*, 67–77.
108. Kwak, J.-Y., Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 851–870.
109. Han, Y. S.; Lee, J. H.; Lee, S. H., Antitumor Effects of Fucoidan on Human Colon Cancer Cells via Activation of Akt Signaling. *Biomolecules & therapeutics* **2015**, *23*, (3), 225-232.
110. Atashrazm, F.; Lowenthal, R. M.; Woods, G. M.; Holloway, A. F.; Dickinson, J. L., Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, (4), 2327-46.
111. Jin, J.-O. S., M.-G.; Kim, Y.-N.; Park, J.-I.; Kwak, J.-Y., The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. *Mol. Carcinog.* **2010**, *49*, 771–782.
112. Park, H. S. H., H. J.; Kim, G.-Y.; Cha, H.-J.; Kim, W.-J.; Kim, N. D.; Yoo, Y. H.; Choi, Y. H., Induction of apoptosis by fucoidan in human leukemia U937 cells through activation of p38 MAPK and modulation of Bcl-2 family. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2347–2364.
113. Zhang, Z. T., K.; Yoshida, T.; Eto, H.; Shirahata, S., Fucoidan Extract Enhances the Anti-Cancer Activity of Chemotherapeutic Agents in MDA-MB-231 and MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 81–98.
114. Park, H. S. K., G.-Y.; Nam, T.-J.; Deuk Kim, N.; Hyun Choi, Y., Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 77–83.
115. Boo, H.-J. H., J.-H.; Kim, S.-C.; Kang, J.-I.; Kim, M.-K.; Kim, S.-Y.; Cho, H.; Yoo, E.-S.; Kang, H.-K., Fucoidan from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 1082–1086.
116. Boo, H.-J. H., J.-Y.; Kim, S.-C.; Kang, J.-I.; Kim, M.-K.; Kim, E.-J.; Hyun, J.-W.; Koh, Y.-S.; Yoo, E.-S.; Kwon, J.-M.; Kang, H.-K., The anticancer effect of fucoidan in PC-3 prostate cancer cells. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2982–2999.
117. Yang, L. W., P.; Wang, H.; Li, Q.; Teng, H.; Liu, Z.; Yang, W.; Hou, L.; Zou, X. , Fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 1961–1976.
118. Shu, Z.; Shi, X.; Nie, D.; Guan, B., Low-Molecular-Weight Fucoidan Inhibits the Viability and Invasiveness and Triggers Apoptosis in IL-1beta-Treated Human Rheumatoid Arthritis Fibroblast Synoviocytes. *Inflammation* **2015**, *38*, (5), 1777-1786.
119. Chen, M. C.; Hsu, W. L.; Hwang, P. A.; Chou, T. C., Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, (7), 4436-4451.
120. Wei, C.; Xiao, Q.; Kuang, X.; Zhang, T.; Yang, Z.; Wang, L., Fucoidan inhibits proliferation of the SKM-1 acute myeloid leukaemia cell line via

- the activation of apoptotic pathways and production of reactive oxygen species. *Molecular medicine reports* **2015**, 12, (5), 6649-6655.
121. Abu, R.; Jiang, Z.; Ueno, M.; Isaka, S.; Nakazono, S.; Okimura, T.; Cho, K.; Yamaguchi, K.; Kim, D.; Oda, T., Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, 458, 727-732.
  122. Cho, Y.; Yoon, J.-H.; Yoo, J.-j.; Lee, M.; Lee, D. H.; Cho, E. J.; Lee, J.-H.; Yu, S. J.; Kim, Y. J.; Kim, C. Y., Fucoidan protects hepatocytes from apoptosis and inhibits invasion of hepatocellular carcinoma by up-regulating p42/44 MAPK-dependent NDRG-1/CAP43. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, 5, (6), 544-553.
  123. Li, J.; Chen, K.; Li, S.; Feng, J.; Liu, T.; Wang, F.; Zhang, R.; Xu, S.; Zhou, Y.; Zhou, S.; Xia, Y.; Lu, J.; Guo, C., Protective effect of fucoidan from *Fucus vesiculosus* on liver fibrosis via the TGF-beta1/Smad pathway-mediated inhibition of extracellular matrix and autophagy. *Drug design, development and therapy* **2016**, 10, 619-630.
  124. Ikeguchi, M.; Saito, H.; Miki, Y.; Kimura, T., Effect of Fucoidan Dietary Supplement on the Chemotherapy Treatment of Patients with Unresectable Advanced Gastric Cancer. *J. Cancer Ther.* **2015**, 06, (11), 1020-1026.
  125. Zhang, S. M.; Xie, Z. P.; Xu, M. L.; Shi, L. F., Cardioprotective effects of fucoidan against hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. *Pharm. Biol.* **2015**, 53, (9), 1352-1357.
  126. Shimizu, J. W.-F., U.; Mano, H.; Matahira, Y.; Kawaguchi, M.; Wada, M., Proportion of murine cytotoxic T cells is increased by high molecular weight fucoidan extracted from *Okinawa mozuku (Cladosiphon okamuranus)*. *J. Health Sci.* **2005**, 51, 394-397.
  127. Yang, C. C., D.; Shina, I.-S.; Lee, H.; Kim, J.; Lee, Y.; You, S., Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 43, 433-437.
  128. Azuma, K. I., T.; Nakamoto, H.; Amaha, T.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Minami, S.; Takashima, O.; Ifuku, S.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Kawamoto, H.; Okamoto, Y., Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model. *Mar. Drugs* **2012**, 10, 2337-2348.
  129. Cho, M. L.; Lee, B. Y.; You, S. G., Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their in vitro anticancer activity. *Molecules* **2010**, 16, (1), 291-297.
  130. Akihiro Kasai, S. A., Nozomi Koshiba, Daisuke Takahashi and Kazunobu Toshima, Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 10556-10568.
  131. Wu, S. Y.; Wu, A. T.; Yuan, K. S.; Liu, S. H., Brown Seaweed Fucoidan Inhibits Cancer Progression by Dual Regulation of mir-29c/ADAM12 and miR-17-5p/PTEN Axes in Human Breast Cancer Cells. *J. Cancer.* **2016**, 7, (15), 2408-2419.

132. Tsai, H. L.; Tai, C. J.; Huang, C. W.; Chang, F. R.; Wang, J. Y., Efficacy of Low-Molecular-Weight Fucoidan as a Supplemental Therapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, (122).
133. Oliveira, C.; Ferreira, A. S.; Novoa-Carballal, R.; Nunes, C.; Pashkuleva, I.; Neves, N. M.; Coimbra, M. A.; Reis, R. L.; Martins, A.; Silva, T. H., The Key Role of Sulfation and Branching on Fucoidan Antitumor Activity. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, (5).
134. Hsu, H. Y.; Lin, T. Y.; Lu, M. K.; Leng, P. J.; Tsao, S. M.; Wu, Y. C., Fucoidan induces Toll-like receptor 4-regulated reactive oxygen species and promotes endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in lung cancer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44990.
135. Olesia S. Vishchuk, H. S., Zhe Wang, Svetlana P. Ermakova, JuanJuan Xiao, Tao Lu, PeiPei Xue, Tatyana N. Zvyagintseva, Hua Xiong, Chen Shao, Wei Yan, Qiuhong Duan, Feng Zhu, PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase is a target of the fucoidan from brown alga *Fucus evanescens* in the prevention of EGF-induced neoplastic cell transformation and colon cancer growth. *Oncotarget* **2016**, *7*, (14), 18763-18773.
136. Chen M.C., H. W. L., Hwang P., Chen Y.L., Chou T.C., Combined administration of fucoidan ameliorates tumor and chemotherapy-induced skeletal muscle atrophy in bladder cancer-bearing mice. *Oncotarget* **2016**, *7*, (32), 51608-51618.
137. Alwarsamy M., G. R., Ravichandran R., Effect of fucoidan from *Turbinaria conoides* on human lung adenocarcinoma epithelial (A549) cells. *Carbohydrate polymers* **2016**, *152*, 207-213.
138. Choo, G. S.; Lee, H. N.; Shin, S. A.; Kim, H. J.; Jung, J. Y., Anticancer Effect of Fucoidan on DU-145 Prostate Cancer Cells through Inhibition of PI3K/Akt and MAPK Pathway Expression. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, (7).
139. Cho, Y.; Cho, E. J.; Lee, J. H.; Yu, S. J.; Kim, Y. J.; Kim, C. Y.; Yoon, J. H., Fucoidan-induced ID-1 suppression inhibits the in vitro and in vivo invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 607-616.
140. Yun, C. W.; Yun, S.; Lee, J. H.; Han, Y. S.; Yoon, Y. M.; An, D.; Lee, S. H., Silencing Prion Protein in HT29 Human Colorectal Cancer Cells Enhances Anticancer Response to Fucoidan. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, (9), 4449-4458.
141. Sun, J.; Song, B.; Zhang, L.; Shao, Q.; Liu, Y.; Yuan, D.; Zhang, Y.; Qu, X., Fucoidan inhibits CCL22 production through NF-kappaB pathway in M2 macrophages: a potential therapeutic strategy for cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35855.
142. Anastyuk, S. D.; Shevchenko, N. M.; Usoltseva Menshova, R. V.; Silchenko, A. S.; Zadorozhny, P. A.; Dmitrenok, P. S.; Ermakova, S. P., Structural features and anticancer activity in vitro of fucoidan derivatives from brown alga *Saccharina cichorioides*. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *157*, 1503-1510.
143. Liu, B.; Kongstad, K. T.; Wiese, S.; Jäger, A. K.; Staerk, D., Edible seaweed as future functional food: Identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors by combined use of high-resolution  $\alpha$ -glucosidase inhibition profiling and HPLC–HRMS–SPE–NMR. *Food Chem.* **2016**, *203*, 16-22.

144. Lakshmana Senthil, S.; Vinoth Kumar, T.; Geetharamani, D.; Suja, G.; Yesudas, R.; Chacko, A., Fucoidan - An alpha-amylase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to NIDDM. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, 81, 644-647.
145. Kim, K.-T.; Rioux, L.-E.; Turgeon, S. L., Molecular weight and sulfate content modulate the inhibition of  $\alpha$ -amylase by fucoidan relevant for type 2 diabetes management. *PharmaNutrition* **2015**, 3, (3), 108-114.
146. Chen, J.; Cui, W.; Zhang, Q.; Jia, Y.; Sun, Y.; Weng, L.; Luo, D.; Zhou, H.; Yang, L., Low molecular weight fucoidan ameliorates diabetic nephropathy via inhibiting epithelial-mesenchymal transition and fibrotic processes. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, 7, (9), 1553-1563.
147. Heeba, G. H.; Morsy, M. A., Fucoidan ameliorates steatohepatitis and insulin resistance by suppressing oxidative stress and inflammatory cytokines in experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Environmental toxicology and pharmacology* **2015**, 40, (3), 907-914.
148. Shan, X.; Liu, X.; Hao, J.; Cai, C.; Fan, F.; Dun, Y.; Zhao, X.; Li, C.; Yu, G., In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**.
149. Wang, Y.; Wang, J.; Zhao, Y.; Hu, S.; Shi, D.; Xue, C., Fucoidan from sea cucumber *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects in insulin resistant mice via activating the PI3K/PKB pathway and GLUT4. *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, 121, 36-42.
150. Wang, J.; Hu, S.; Jiang, W.; Song, W.; Cai, L., Fucoidan from sea cucumber may improve hepatic inflammatory response and insulin resistance in mice. *International immunopharmacology* **2015**, 31, 15-23.
151. Xu Y., Z. Q., Luo D., Wang J., Duan D., Low molecular weight fucoidan modulates P-selectin and alleviates diabetic nephropathy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 91, 233-240.
152. Wang P.C., Z. S., Yang B.Y., Wang Q.H., Kuang H.X., Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 148, 86-97.
153. Liang Z., Z. Y., Wang J., Zhang Q., Ren S., Liu T., Wang Z., Luo D., Low molecular weight fucoidan ameliorates streptozotocin-induced hyper-responsiveness of aortic smooth muscles in type 1 diabetes rats. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, 191, 341-349.
154. Hu, S.; Wang, J.; Wang, J.; Li, S.; Jiang, W.; Liu, Y., Renoprotective effect of fucoidan from *Acaudina molpadioides* in streptozotocin/high fat diet-induced type 2 diabetic mice. *J. Func. Foods* **2017**, 31, 123-130.
155. Lin, H. V.; Tsou, Y. C.; Chen, Y. T.; Lu, W. J.; Hwang, P. A., Effects of Low-Molecular-Weight Fucoidan and High Stability Fucoxanthin on Glucose Homeostasis, Lipid Metabolism, and Liver Function in a Mouse Model of Type II Diabetes. *Mar. Drugs* **2017**, 15, (113).
156. Thelen, T. H., Y.; Medeiros, A. I.; Curtis, J. L.; Serezani, C. H.; Kobzik, L.; Harris, L. H.; Aronoff, D. M., The class A scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure, is the major phagocytic receptor for *Clostridium sordellii* expressed by human decidual macrophages. *J. Immunol.* **2010**, 185, 4328-4335.

157. Hu, Y. C., S. C.-S.; Chan, K.-T.; Ke, Y.; Xue, B.; Sin, F. W.-Y.; Zeng, C.; Xie, Y., Fucoidin enhances dendritic cell-mediated T-cell cytotoxicity against NY-ESO-1 expressing human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 392, 329–334.
158. Yang, M. M., C.; Sun, J.; Shao, Q.; Gao, W.; Zhang, Y.; Li, Z.; Xie, Q.; Dong, Z.; Qu, X., Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *International immunopharmacology* **2008**, 8, 1754–1760.
159. Isnansetyo, A.; Fikriyah, A.; Kasanah, N.; Murwantoko, Non-specific immune potentiating activity of fucoidan from a tropical brown algae (*Phaeophyceae*), *Sargassum cristaeifolium* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Int.* **2016**, 24, 465-477.
160. Myers, S. P. O. C., J.; Fitton, J. H.; Brooks, L.; Rolfe, M.; Connellan, P.; Wohlmuth, H.; Cheras, P. A.; Morris, C., A combined Phase I and II open-label study on the immunomodulatory effects of seaweed extract nutrient complex. *Biol. Targets Ther.* **2011**, 5, 45–60.
161. Yuguchi, Y.; Tran, V. T.; Bui, L. M.; Takebe, S.; Suzuki, S.; Nakajima, N.; Kitamura, S.; Thanh, T. T., Primary structure, conformation in aqueous solution, and intestinal immunomodulating activity of fucoidan from two brown seaweed species *Sargassum crassifolium* and *Padina australis*. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 147, 69-78.
162. Sharma, P., Cosmeceuticals: regulatory scenario in US, Europe & India. *Int. J. Pharm. Technol.* **2012**, 3, 1512–1535.
163. Rupérez, P. A., O.; Leal, J. A., Potential Antioxidant Capacity of Sulfated Polysaccharides from the Edible Marine Brown Seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 840–845.
164. Rocha De Souza, M. C. M., C. T.; Guerra Dore, C. M.; Ferreira Da Silva, F. R.; Oliveira Rocha, H. A.; Leite, E. L., Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **2007**, 19, 153–160.
165. Costa, L. S. F., G. P.; Telles, C. B. S.; Dantas-Santos, N.; Camara, R. B. G.; Cordeiro, S. L.; Costa, M. S. S. P.; Almeida-Lima, J.; Melo-Silveira, R. F.; Oliveira, R. M.; Albuquerque, I. R. L.; Andrade, G. P. V.; Rocha, H. A. O., Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 952–966.
166. Wang, J. Z., Q.; Zhang, Z.; Li, Z., Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 42, 127–132.
167. Li, B.; Liu, S.; Xing, R.; Li, K.; Li, R.; Qin, Y.; Wang, X.; Wei, Z.; Li, P., Degradation of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 92, (2), 1991-1996.
168. Hou, Y.; Wang, J.; Jin, W.; Zhang, H.; Zhang, Q., Degradation of *Laminaria japonica* fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87, (1), 153-159.
169. Mak, W.; Hamid, N.; Liu, T.; Lu, J.; White, W. L., Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 95, 606– 614.

170. Hifney, A. F.; Fawzy, M. A.; Abdel-Gawad, K. M.; Gomaa, M., Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum* sp. and its potential antioxidant and emulsifying activities. *Food Hydrocoll.* **2016**, *54*, 77-88.
171. Holdt, S. L. K., S., Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 543–597.
172. O'Doherty, J. V. M., P.; Figat, S., The effect of dietary laminarin and fucoidan in the diet of the weanling piglet on performance and selected faecal microbial populations. *Livest. Sci.* **2010**, *134*, 208–210.
173. Traifalgar, R. F. K., H.; Tung, H. T.; Michael, F. R.; Laining, A.; Yokoyama, S.; Ishikawa, M.; Koshio, S.; Serrano, A. E.; Corre, V., Influence of Dietary Fucoidan Supplementation on Growth and Immunological Response of Juvenile *Marsupenaeus japonicus*. *J. World Aquac. Soc.* **2010**, *41*, 235–244.
174. Lynch, M. B. S., T.; Callan, J. J.; O'Sullivan, J. T.; O'Doherty, J. V., The effect of dietary *Laminaria* derived laminarin and fucoidan on intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. *Livest. Sci.* **2010**, *133*, 157–160.
175. Walsh, A. M. S., T.; O'Shea, C. J.; Doyle, D. N.; O'Doherty, J. V., Effect of supplementing varying inclusion levels of laminarin and fucoidan on growth performance, digestibility of diet components, selected faecal microbial populations and volatile fatty acid concentrations in weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2013**, *183*, 151–159.
176. Zaporozhets, T. S.; Besednova, N. N.; Kuznetsova, T. A.; Zvyagintseva, T. N.; Makarenkova, I. D.; Kryzhanovsky, S. P.; Melnikov, V. G., The prebiotic potential of polysaccharides and extracts of seaweeds. *Russ. J. Mar. Biol.* **2014**, *40*, (1), 1-9.
177. Moroney, N. C. O. G., M. N.; O'Doherty, J. V.; Kerry, J. P., Addition of seaweed (*Laminaria digitata*) extracts containing laminarin and fucoidan to porcine diets: Influence on the quality and shelf-life of fresh pork. *Meat Sci.* **2012**, *92*, 423–429.
178. Moroney, N. C.; O'Grady, M. N.; Lordan, S.; Stanton, C.; Kerry, J. P., Seaweed polysaccharides (laminarin and fucoidan) as functional ingredients in pork meat: an evaluation of anti-oxidative potential, thermal stability and bioaccessibility. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, (4), 2447-2464.
179. Fitton, H. I., M.; Falk, N., Macroalgal fucoidan extracts: A new opportunity for marine cosmetics. *Cosmet. Toil.* **2007**, *122*, 55–64.
180. Phull, A. R.; Majid, M.; Haq, I. U.; Khan, M. R.; Kim, S. J., In vitro and in vivo evaluation of anti-arthritis, antioxidant efficacy of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *97*, 468-480.
181. Saravana, P. S.; Cho, Y. J.; Park, Y. B.; Woo, H. C.; Chun, B. S., Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *153*, 518-525.
182. S. Mohsin, R. M., A. S. Sumayya, G. Muraleedhara Kurup, Bifunctional effect of fucoidan from *Padina tetrastratica* against human pathogenic microbes and free radicals. *J. Med. Herbs Ethnomed.* **2016**, *2*, (2), 1-10.



183. Chen, H.; Cong, Q.; Du, Z.; Liao, W.; Zhang, L.; Yao, Y.; Ding, K., Sulfated fucoidan FP08S2 inhibits lung cancer cell growth in vivo by disrupting angiogenesis via targeting VEGFR2/VEGF and blocking VEGFR2/Erk/VEGF signaling. *Cancer letters* **2016**, 382, (1), 44-52.
184. Lake, A. C.; Vassy, R.; Di Benedetto, M.; Lavigne, D.; Le Visage, C.; Perret, G. Y.; Letourneur, D., Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *The Journal of biological chemistry* **2006**, 281, (49), 37844-52.
185. Venkatesan, J.; Anil, S.; Kim, S.-K.; Shim, M., Seaweed Polysaccharide-Based Nanoparticles: Preparation and Applications for Drug Delivery. *Polymers* **2016**, 8, (2), 30.
186. Cunha, L.; Grenha, A., Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Mar. Drugs* **2016**, 14, (3), 42.
187. Silva, V. A. J. A., P. L.; Silva, M. P. C.; Bustamante, A. D.; De Los Santos Valladares, L.; Albino Aguiar, J., Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with fucan polysaccharides. *J. Magn. Mater.* **2013**, 343, 138–143.
188. Andrade, P. L.; Silva, V. A. J.; Silva, M. P. C.; Albino Aguiar, J., Synthesis and Characterization of Fucan-Coated Cobalt Ferrite Nanoparticles. *J. Supercond. Novel Magn.* **2012**, 26, (7), 2511-2514.
189. Leung, T. C.-Y. W., C. K.; Xie, Y., Green synthesis of silver nanoparticles using biopolymers, carboxymethylated-curdlan and fucoidan. *Mater. Chem. Phys.* **2010**, 121, 402–405.
190. Nagarajan, S. A. K., K., Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of gulf of Mannar, India. *J. Nanobiotechnol.* **2013**, 11, 39.
191. Soisuwan, S. W., W.; Lirdprapamongkol, K.; Svasti, J., Eco-friendly synthesis of fucoidan-stabilized gold nanoparticles. *Am. J. Appl. Sci.* **2010**, 7, 1038–1042.
192. Lee, E. J. L., K.H., Polyelectrolyte complexes of chitosan self-assembled with fucoidan: An optimum condition to prepare their nanoparticles and their characteristics. *Korean J. Chem. Eng.* **2014**, 31, 664–675.
193. Lee, E. J. L., K.-H., Formation of chitosan-fucoidan nanoparticles and their electrostatic interactions: Quantitative analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, 121, 73–83.
194. Ho, T. T. M.; Bremmell, K. E.; Krasowska, M.; Stringer, D. N.; Thierry, B.; Beattie, D. A., Tuning polyelectrolyte multilayer structure by exploiting natural variation in fucoidan chemistry. *Soft Matter* **2015**, 11, (11), 2110-2124.
195. Chollet, L.; Saboural, P.; Chauvierre, C.; Villemin, J. N.; Letourneur, D.; Chaubet, F., Fucoidans in Nanomedicine. *Mar. Drugs* **2016**, 14, (8).
196. Bachelet-Violette, L.; Silva, A. K. A.; Maire, M.; Michel, A.; Brinza, O.; Ou, P.; Ollivier, V.; Nicoletti, A.; Wilhelm, C.; Letourneur, D.; Ménager, C.; Chaubet, F., Strong and specific interaction of ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles and human activated platelets mediated by fucoidan coating. *RSC Adv.* **2014**, 4, (10), 4864-4871.

197. Bonnard, T. Y., G.; Petiet, A.; Ollivier, V.; Haddad, O.; Arnaud, D.; Louedec, L.; Bachelet-Violette, L.; Derkaoui, S. M.; Letourneur, D.; Chauvierre, C.; Le Visage, C., Abdominal Aortic Aneurysms Targeted by Functionalized Polysaccharide Microparticles: a new Tool for SPECT Imaging. *Theranostics* **2014**, 4, 592–603.
198. Rouzet, F.; Bachelet-Violette, L.; Alsac, J. M.; Suzuki, M.; Meulemans, A.; Louedec, L.; Petiet, A.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Michel, J. B.; Le Guludec, D.; Letourneur, D., Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **2011**, 52, (9), 1433-1440.
199. Bonnard, T. S., J.-M.; Journé, C.; Ho Tin Noe, B.; Arnaud, D.; Louedec, L.; Derkaoui, S. M.; Letourneur, D.; Chauvierre, C.; Le Visage, C., Leukocyte mimetic polysaccharide microparticles tracked in vivo on activated endothelium and in abdominal aortic aneurysm. *Acta Biomater.* **2014**, 10, 3535–3545.
200. Saboural, P.; Chaubet, F.; Rouzet, F.; Al-Shoukr, F.; Ben Azzouna, R.; Bouchemal, N.; Picton, L.; Louedec, L.; Maire, M.; Rolland, L.; Potier, G.; Le Guludec, D.; Letourneur, D.; Chauvierre, C., Purification of a Low Molecular Weight Fucoidan for SPECT Molecular Imaging of Myocardial Infarction. *Mar. Drugs* **2014**, 12, 4851-4867.
201. Desbree, A.; Bonnard, T.; Blanchardon, E.; Petiet, A.; Franck, D.; Chauvierre, C.; Le Visage, C., Evaluation of Functionalized Polysaccharide Microparticles Dosimetry for SPECT Imaging Based on Biodistribution Data of Rats. *Mol. Imaging Biol.* **2015**, 17, (4), 504-511.
202. Li, X.; Bauer, W.; Israel, I.; Kreissl, M. C.; Weirather, J.; Richter, D.; Bauer, E.; Herold, V.; Jakob, P.; Buck, A.; Frantz, S.; Samnick, S., Targeting P-Selectin by Gallium-68-Labeled Fucoidan Positron Emission Tomography for Noninvasive Characterization of Vulnerable Plaques Correlation With In Vivo 17.6T MRI. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, 34, (8), 1661-1667.
203. Sezer, A. D. A., J., Fucosphere - New microsphere carriers for peptide and protein delivery: Preparation and in vitro characterization. *J. Microencapsul.* **2006**, 23, 513–522.
204. Nakamura, S. N., M.; Ishizuka, T.; Hattori, H.; Kanatani, Y.; Takase, B.; Kishimoto, S.; Amano, Y.; Aoki, H.; Kiyosawa, T.; Ishihara, M.; Maehara, T., Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *J. Biomed. Mater. Res.* **2008**, 85, 619–627.
205. Huang, Y.-C. Y., Y.-T., Effect of basic fibroblast growth factor released from chitosan-fucoidan nanoparticles on neurite extension. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**, 10, 418-427.
206. Huang, Y.-C. L., T.-J., Mobilization of mesenchymal stem cells by stromal cell-derived factor-1 released from chitosan/tripolyphosphate/fucoidan nanoparticles. *Acta Biomater.* **2012**, 8, 1048–1056.
207. Park, S. H., S.; Lee, J., pH-responsive hydrogels from moldable composite microparticles prepared by coaxial electro-spray drying. *Chem. Eng. J.* **2011**, 169, 348–357.

208. Yu, S. H.; Wu, S. J.; Wu, J. Y.; Wen, D. Y.; Mi, F. L., Preparation of fucoidan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 126, 97-107.
209. Huang, Y. C.; Li, R. Y., Preparation and Characterization of Antioxidant Nanoparticles Composed of Chitosan and Fucoidan for Antibiotics Delivery. *Mar. Drugs* **2014**, 12, 4379-4398.
210. Huang, Y.-C. L., U.-I., Chitosan/fucoidan pH sensitive nanoparticles for oral delivery system. *J. Chin. Chem. Soc.* **2011**, 58, 779–785.
211. Lee, K. W. J., D.; Na, K., Doxorubicin loading fucoidan acetate nanoparticles for immune and chemotherapy in cancer treatment. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 94, 850–856.
212. Kimura, R. R., T.; Takeda, S.; Senba, M.; Mori, N., Cytotoxic effects of fucoidan nanoparticles against osteosarcoma. *Mar. Drugs* **2013**, 11, 4267–4278.
213. Yu, S.-H. T., D.-W.; Hsieh, H.-Y.; Wu, W.-S.; Lin, B.-X.; Chuang, E.-Y.; Sung, H.-W.; Mi, F.-L., Nanoparticles-induced tight junction opening for the transport of an anti-angiogenic sulfated polysaccharide across Caco-2 cell monolayers. *Acta Biomater.* **2013**, 9, 7449–7459.
214. Huang, Y. C.; Kuo, T. H., O-carboxymethyl chitosan/fucoidan nanoparticles increase cellular curcumin uptake. *Food Hydrocoll.* **2016**, 53, 261-269.
215. Wu, S. J.; Don, T. M.; Lin, C. W.; Mi, F. L., Delivery of Berberine Using Chitosan/Fucoidan-Taurine Conjugate Nanoparticles for Treatment of Defective Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier. *Mar. Drugs* **2014**, 12, 5677-5697.
216. Pinheiro, A. C.; Bourbon, A. I.; Cerqueira, M. A.; Maricato, E.; Nunes, C.; Coimbra, M. A.; Vicente, A. A., Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 115, 1-9.
217. Manivasagan, P.; Bharathiraja, S.; Bui, N. Q.; Jang, B.; Oh, Y. O.; Lim, I. G.; Oh, J., Doxorubicin-loaded fucoidan capped gold nanoparticles for drug delivery and photoacoustic imaging. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 91, 578-588.
218. Rocha Amorim, M. O.; Lopes Gomes, D.; Dantas, L. A.; Silva Viana, R. L.; Chiquetti, S. C.; Almeida-Lima, J.; Silva Costa, L.; Oliveira Rocha, H. A., Fucan-coated silver nanoparticles synthesized by a green method induce human renal adenocarcinoma cell death. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 93, 57-65.
219. Lu, K. Y.; Li, R.; Hsu, C. H.; Lin, C. W.; Chou, S. C.; Tsai, M. L.; Mi, F. L., Development of a new type of multifunctional fucoidan-based nanoparticles for anticancer drug delivery. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 165, 410-420.
220. Hwang, P.-A.; Lin, X.-Z.; Kuo, K.-L.; Hsu, F.-Y., Fabrication and Cytotoxicity of Fucoidan-Cisplatin Nanoparticles for Macrophage and Tumor Cells. *Materials* **2017**, 10, (3), 291.
221. Yeh, T.-H. H., L.-W.; Tseng, M. T.; Lee, P.-L.; Sonjae, K.; Ho, Y.-C.; Sung, H.-W., Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials* **2011**, 32, 6164–6173.

222. Da Silva, L. C. G., T.; Mori, M.; Sandri, G.; Bonferoni, M. C.; Finotelli, P. V.; Cinelli, L. P.; Caramella, C.; Cabral, L. M., Preparation and characterization of polysaccharide-based nanoparticles with anticoagulant activity. *International journal of nanomedicine* **2012**, 7, 2975–2986.
223. Sezer, A. D. A., J., Comparison on in vitro characterization of fucospheres and chitosan microspheres encapsulated plasmid DNA (pGM-CSF): Formulation design and release characteristics. *AAPS PharmSciTech* **2009**, 10, 1193–1199.
224. Kurosaki, T. K., T.; Kawakami, S.; Nishida, K.; Nakamura, J.; Teshima, M.; Nakagawa, H.; Kodama, Y.; To, H.; Sasaki, H., The development of a gene vector electrostatically assembled with a polysaccharide capsule. *Biomaterials* **2009**, 30, 4427–4434.
225. Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Kim, S. K., Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Mar. Drugs* **2014**, 12, (1), 300-316.
226. Jeong, H. S.; Venkatesan, J.; Kim, S. K., Hydroxyapatite-fucoidan nanocomposites for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 57, 138-141.
227. Lowe, B.; Venkatesan, J.; Anil, S.; Shim, M. S.; Kim, S. K., Preparation and characterization of chitosan-natural nano hydroxyapatite-fucoidan nanocomposites for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**.
228. Puvaneswary, S.; Talebian, S.; Raghavendran, H. B.; Murali, M. R.; Mehrali, M.; Afifi, A. M.; Kasim, N. H.; Kamarul, T., Fabrication and in vitro biological activity of betaTCP-Chitosan-Fucoidan composite for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 134, 799-807.
229. Changotade, S. I.; Korb, G.; Bassil, J.; Barroukh, B.; Willig, C.; Collic-Jouault, S.; Durand, P.; Godeau, G.; Senni, K., Potential effects of a low-molecular-weight fucoidan extracted from brown algae on bone biomaterial osteoconductive properties. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, 87, (3), 666-675.
230. Jin, G.; Kim, G. H., Rapid-prototyped PCL/fucoidan composite scaffolds for bone tissue regeneration: design, fabrication, and physical/biological properties. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, (44), 17710-17718.
231. Tae Young, A.; Kang, J. H.; Kang, D. J.; Venkatesan, J.; Chang, H. K.; Bhatnagar, I.; Chang, K. Y.; Hwang, J. H.; Salameh, Z.; Kim, S. K.; Kim, H. T.; Kim, D. G., Interaction of stem cells with nano hydroxyapatite-fucoidan bionanocomposites for bone tissue regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 93, 1488-1491.
232. Sezer, A. D. C., E.; Hatipoglu, F.; Ogurtan, Z.; Bas, A. L.; Akbuga, J., Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31, 2326–2333.
233. Sezer, A. D. C., E.; Hatipoğlu, F.; Oğurtan, Z.; Baş, A. L.; Akbuğa, J., The use of fucosphere in the treatment of dermal burns in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 69, 189–198.
234. Lee, J. S.; Jin, G. H.; Yeo, M. G.; Jang, C. H.; Lee, H.; Kim, G. H., Fabrication of electrospun biocomposites comprising polycaprolactone/fucoidan for tissue regeneration. *Carbohydrate polymers* **2012**, 90, (1), 181-8.

235. Suzuki, M.; Bachelet-Violette, L.; Rouzet, F.; Beilvert, A.; Autret, G.; Maire, M.; Menager, C.; Louedec, L.; Choqueux, C.; Saboural, P.; Haddad, O.; Chauvierre, C.; Chaubet, F.; Michel, J.-B.; Serfaty, J.-M.; Letourneur, D., Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus. *Nanomedicine* **2015**, 10, (1), 73-87.
236. Ermakova, S.; Kusaykin, M.; Trincone, A.; Tatiana, Z., Are multifunctional marine polysaccharides a myth or reality? *Front. Chem.* **2015**, 3, 39.
237. Seeberger, P. H.; Werz, D. B., Synthesis and medical applications of oligosaccharides. *Nature* **2007**, 446, 1046-1051
238. Linhardt, R. J. G., N.S., Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Semin. Thromb. Hemost.* **1999**, 25, 5-16.
239. Chavarroche, A. A. v. d. B., L.A.; Eggink, G., Production methods for heparosan, a precursor of heparin and heparan sulfate. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 93, 38-47.
240. Gray, E. M., B.; Barrowcliffe, T.W., Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb. Haemost.* **2008**, 99, 807-818.
241. Kakkar, V. V. D., B.; Fok, J.; Fletcher, M.; Scully, M.F.; Westwick, J., Low-molecular-weight heparin and prevention of postoperative deep vein thrombosis. *Br. Med. J.* **1982**, 284, 375-379.
242. Liu, H. Z., Z.; Linhardt, R.J., Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 313-321.
243. Sainz, V. C., J.; Matos, A.I.; Peres, C.; Zupancic, E.; Moura, L.; Silva, L.C.; Florindo, H.F.; Gaspar, R.S., Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2015**, 468, 504-510.
244. Lira, M. C.; Santos-Magalhaes, N. S.; Nicolas, V.; Marsaud, V.; Silva, M. P.; Ponchel, G.; Vauthier, C., Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* **2011**, 79, (1), 162-70.
245. Finegold, J. A. A., P.; Francis, D.P., Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int. J. Cardiol.* **2013**, 168, 934-945.
246. Morel, D. W.; Hessler, J. R.; Chisolm, G. M., Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J. Lipid Res.* **1983**, 24, (8), 1070-1076.
247. Berliner, J.; Leitinger, N.; Watson, A.; Huber, J.; Fogelman, A.; Navab, M., Oxidized lipids in atherogenesis : formation, destruction and action. *Thromb. Haemost.* **1997**, 78, (1), 471-474.
248. Ley, K., The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med.* **2003**, 9, (6), 263-268.
249. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, 32, (9), 2045-2051.
250. Juenet, M.; Varna, M.; Aid-Launais, R.; Chauvierre, C.; Letourneur, D., Nanomedicine for the molecular diagnosis of cardiovascular pathologies. *Biochemical and biophysical research communications* **2015**, 468, (3), 476-84.
251. Li, B.; Juenet, M.; Aid-Launais, R.; Maire, M.; Ollivier, V.; Letourneur, D.; Chauvierre, C., Development of Polymer Microcapsules Functionalized

- with Fucoidan to Target P-Selectin Overexpressed in Cardiovascular Diseases. *Adv. Healthcare Mater.* **2017**, 6, 1601200.
252. Ghebouli, R.; Loyau, S.; Maire, M.; Saboural, P.; Collet, J. P.; Jandrot-Petrus, M.; Letourneur, D.; Chaubet, F.; Michel, J. B., Amino-Fucoidan as a vector for rtPA-induced fibrinolysis in experimental thrombotic events. *Thromb. Haemost.* **2017**, in press.
253. Chauvierre, C.; Letourneur, D., The European project NanoAthero to fight cardiovascular diseases using nanotechnologies. *Nanomedicine* **2015**, 10, (22), 3391-3400.
254. Blann, A. D.; Nadar, S. K.; Lip, G. Y. H., The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* **2003**, 24, (24), 2166-2179.
255. Gout, S.; Tremblay, P. L.; Huot, J., Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, 25, (4), 335-344.
256. McEver, R. P., Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc. Res.* **2015**, 107, (3), 331-339.
257. Choudhury, R. P.; E.A., F., Molecular Imaging in Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, 29, (7), 983-991.
258. Silva, A. K. A.; Letourneur, D.; Chauvierre, C., Polysaccharide Nanosystems for Future Progress in Cardiovascular Pathologies. *Theranostics* **2014**, 4, (6), 579-591.
259. McAteer, M. A.; Mankia, K.; Ruparelia, N.; Jefferson, A.; Nugent, H. B.; L.A., S.; Channon, K. M.; Schneider, J. E.; Choudhury, R. P., A leukocyte-mimetic magnetic resonance imaging contrast agent homes rapidly to activated endothelium and tracks with atherosclerotic lesion macrophage content. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, 32, (6), 1427-1435.
260. B.A., K.; Lewis, C.; Xie, A.; Mirza-Mohd, A.; Lindner, J. R., Detection of recent myocardial ischaemia by molecular imaging of P-selectin with targeted contrast echocardiography. *Eur. Heart J.* **2007**, 28, (16), 2011-2017.
261. Jin, A. Y.; Tuor, U. I.; Rushforth, D.; Filfil, R.; Kaur, J.; Ni, F.; Tomanek, B.; Barber, P. A., Magnetic resonance molecular imaging of post-stroke neuroinflammation with a P-selectin targeted iron oxide nanoparticle. *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, 4, (6), 305-311.
262. Molenaar, T. J. M., Specific inhibition of P-selectin-mediated cell adhesion by phage display-derived peptide antagonists. *Blood* **2002**, 100, (10), 3570-3577.
263. Jin, A. Y.; Tuor, U. I.; Rushforth, D.; Kaur, J.; Muller, R. N.; Petterson, J. L.; Boutry, S.; Barber, P. A., Reduced blood brain barrier breakdown in P-selectin deficient mice following transient ischemic stroke: a future therapeutic target for treatment of stroke. *BMC Neurosci.* **2010**, 11, (12).
264. Ferrante, E. A.; Pickard, J. E.; Rychak, J.; Klibanov, A.; Ley, K., Dual targeting improves microbubble contrast agent adhesion to VCAM-1 and P-selectin under flow. *J. Control Release* **2009**, 140, (2), 100-107.
265. Ramphal, J. Y.; Zheng, Z. L.; Perez, C.; Walker, L. E.; DeFrees, S. A.; Gaeta, F. C. A., Structure-Activity Relationships of Sialyl Lewis x-

- Containing Oligosaccharides. 1. Effect of Modifications of the Fucose Moiety. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, (21), 3459-3463.
266. Leppänen, A.; White, S. P.; Helin, J.; McEver, R. P.; Cummings, R. D., Binding of glycosulfopeptides to P-selectin requires stereospecific contributions of individual tyrosine sulfate and sugar residues. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, (50), 39569-39578.
267. Brandley, B. K.; Kiso, M.; Abbas, S.; Nikrad, P.; Srivasatava, O.; Foxall, C.; Oda, Y.; Hasegawa, A., Structure-function studies on selectin carbohydrate ligands. Modifications to fucose, sialic acid and sulphate as a sialic acid replacement. *Glycobiology* **1993**, 3, (6), 633-641.
268. Ramachandran, V.; Nollert, M. U.; Qiu, H.; Liu, W. J.; Cummings, R. D.; Zhu, C.; McEver, R. P., Tyrosine replacement in P-selectin glycoprotein ligand-1 affects distinct kinetic and mechanical properties of bonds with P- and L-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, (24), 13771-13776.
269. Dische, Z., New Color Reactions for Determination of Sugars in Polysaccharides. *Meth. Biochem. Anal.* **1955**, 2, 313-358.
270. Bitter, T. M., H.M., A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **1962**, 4, 330-334.
271. Zhang, J.; Zhang, Q.; Wang, J.; Shi, X.; Zhang, Z., Analysis of the monosaccharide composition of fucoidan by precolumn derivation HPLC. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* **2009**, 27, (3), 578-582.
272. Gustafsson, L., Determination of ultramicro amounts of sulphate as methylene blue—II The reduction. *Talanta* **1960**, 4, 236-243.
273. Kuban, V.; Dasgupta, P. K.; Marx, J. N., Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 36-43.
274. Kondo, A. S., J.; Kuraya, N.; Hase, S.; Kato, I.; Ikenaka, T. , Improved method for fluorescence labeling of sugar chains with sialic acid residues. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, 54, 2169-2170.
275. Seo, J. H. A., K.; Lee, B. K.; Kang, D. G.; Kim, Y. K.; Kim, K. R.; Lee, H. Y.; Kawai, T.; Cha, H. J. , Facile and rapid direct gold surface immobilization with controlled orientation for carbohydrates. *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18, 2197-2201.
276. Schiener, P.; Black, K. D.; Stanley, M. S.; Green, D. H., The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *J Appl Phycol* **2015**, 27, (1), 363-373.
277. Bernardi, G. S., G.F., Properties of highly purified fucan. *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 75-80.
278. Dische, Z., A new specific color reaction of hexuronic acids *J. Biol. Chem.* **1947**, 167, 189-198.
279. Bowness, J. M., 5-Formylfuroic Acid and the Carbazole Reaction for Uronic Acids and Acidic Polysaccharides. *Biochem. J.* **1958**, 70, 107-110.
280. Mu, J.; Perlmutter, D. D., Thermal Decomposition of Inorganic Sulfates and Their Hydrates. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **1981**, 20, (4), 640-646.

281. Daemi, H.; Barikani, M., Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica* **2012**, 19, (6), 2023-2028.
282. Jin, W.; Zhang, W.; Liang, H.; Zhang, Q., The Structure-Activity Relationship between Marine Algae Polysaccharides and Anti-Complement Activity. *Marine drugs* **2015**, 14, (1).
283. Marcel Tutor Ale, J. D. M., Anne S. Meyer, Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Marine drugs* **2011**, 9, 2106-2130.
284. Science, G. H. L., *Biocore Sensor Surface Handbook BR-1005-71*. Vol. Edition AB.
285. Nguyen, H. H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M., Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors* **2015**, 15, (5), 10481-10510.
286. Gedig, E. T., Surface chemistry in SPR technology. In *Handbook of surface plasmon resonance*, Schasfoort, R. B. M.; Tudos, A. J., Eds. 2008; pp 173-220.
287. Mévellec, V.; Roussel, S.; Tessier, L.; Chancolon, J.; Mayne-L'Hermite, M.; Deniau, G.; Viel, P.; Palacin, S., Grafting Polymers on Surfaces: A New Powerful and Versatile Diazonium Salt-Based One-Step Process in Aqueous Media. *Chem. Mater.* **2007**, 19, 6323–6330.
288. Berthelot, T.; Garcia, A.; Viel, P.; Roussel, S.; Nekelson, F. Method for preparing a metallised substrate, the resulting substrate and the uses thereof. 2009.
289. Mesnage, A.; Esnouf, S.; Jégou, P.; Deniau, G.; Palacin, S., Understanding the Redox-Induced Polymer Grafting Process: A Dual Surface-Solution Analysis. *Chem. Mater.* **2010**, 22, (23), 6229-6239.
290. Berthelot, T.; Garcia, A.; Le, X. T.; El Morsli, J.; Jégou, P.; Palacin, S.; Viel, P., "Versatile toolset" for DNA or protein immobilization: Toward a single-step chemistry. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, 257, (8), 3538-3546.
291. Berthelot, T.; Viel, P. Process for functionalizing a surface with an object or molecule of interest. 2012.
292. Viel, P.; Le, X. T.; Huc, V.; Bar, J.; Benedetto, A.; Le Goff, A.; Filoramo, A.; Alamarguy, D.; Noël, S.; Baraton, L.; Palacin, S., Covalent grafting onto self-adhesive surfaces based on aryldiazonium salt seed layers. *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 5913-5920.
293. Berthelot, T.; Garcia, A.; Viel, P.; Jousset, B. Process for preparing an organic film at the surface of a solid support by transfer or by spraying. 2012.
294. Credou, J.; Faddoul, R.; Berthelot, T., One-step and eco-friendly modification of cellulose membranes by polymer grafting. *RSC Adv.* **2014**, 4, 60959-60969.
295. Berthelot, T.; Viel, P. Process for modifying a polydopamine polymer or a derivative thereof, and polymer thus modified. . 2012.
296. Haverslag, R.; Pasterkamp, G.; Hofer, I. E., Targeting Adhesion Molecules in Cardiovascular Disorders. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* **2008**, 8, (4), 252-260.



297. Mohamed, A. A.; Salmi, Z.; Dahoumane, S. A.; Mekki, A.; Carbonnier, B.; Chehimi, M. M., Functionalization of nanomaterials with aryldiazonium salts. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *225*, 16-36.
298. Heyn, A. N., The infrared absorption spectrum of dextran and its bound water. *Biopolymers* **1974**, *13*, (3), 475-506.
299. Nikolić, G. S.; Cakić, M. D., Analysis of Bioactive Olygosaccharide-Metal Complexes by Modern FTIR Spectroscopy: Copper Complexes In *Fourier Transforms - New Analytical Approaches and FTIR Strategies*, InTech, Ed. 2011; pp 15-44.
300. Hjerde, T.; Smidsrød, O.; Stokke, B. T.; Christensen, B. E., Acid Hydrolysis of  $\kappa$ - and  $\iota$ -Carrageenan in the Disordered and Ordered Conformations: Characterization of Partially Hydrolyzed Samples and Single-Stranded Oligomers Released from the Ordered Structures. *Macromolecules* **1998**, *31*, (6), 1842–1851.
301. Petit, A.-C.; Noiret, N.; Sinquin, C.; Ratiskol, J.; Guézennec, J.; Collic-Jouault, S., Free-radical depolymerization with metallic catalysts of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64*, 597-602.
302. Cheng, Y.; Prud'homme, R. K., Enzymatic Degradation of Guar and Substituted Guar Galactomannans. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, (4), 782-788.
303. Cote, G. L.; Willet, J. L., Thermomechanical depolymerization of dextran. *Carbohydr. Polym.* **1999**, *39*, (2), 119-126.
304. Reddy, T. T.; Tammishetti, S., Free radical degradation of guar gum. *Polym. Degrad. Stabil.* **2004**, *86*, (3), 455-459.
305. Portenlanger, G.; Heusinger, H., The influence of frequency on the mechanical and radical effects for the ultrasonic degradation of dextrans. *Ultrasonics Sonochem.* **1997**, *4*, (2), 127-130.
306. Bertolini, A. C.; C.Mestres; Colonna, P.; Raffi, J., Free radical formation in UV- and gamma-irradiated cassava starch. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *44*, (3), 269-271.
307. Zhang, H. J.; Mao, W. J.; Fang, F.; Li, H. Y.; Sun, H. H.; Chen, Y.; Qi, X. H., Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *71*, (3), 428-434.
308. Qin, C. Q.; Du, Y. M.; Xiao, L., Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polym. Degrad. Stabil.* **2002**, *76*, (2), 211-218.
309. Harmon, R. E.; Gupta, S. K.; Johnson, J., Oxidation of Starch by Hydrogen Peroxide in the Presence of UV Light - Part. I. *Starch – Stärke* **1971**, *23*, (10), 347-349.
310. Zeronian, S. H.; Inglesby, M. K., Bleaching of cellulose by hydrogen peroxide. *Cellulose* **1995**, *2*, (4), 265-272.
311. Ahrgren, L.; De Belder, A. N., The Action of Fenton's Reagent on Dextran. *Starch – Stärke* **1975**, *27*, (4), 121-123.
312. Liu, Z.; Perlin, A. S., Evidence of a selective free radical degradation of heparin, mediated by cupric ion. *Carbohydr. Res.* **1994**, *255*, 183-191.

313. Volpi, N., Dermatan sulfate from beef mucosa: structure, physicochemical and biological properties of fractions prepared by chemical depolymerization and anion-exchange chromatography. *Carbohydr. Res.* **1994**, *255*, 133-134.
314. Vismara E.; Pierini M.; Guglieri S.; Liverani L.; Mascellani G.; G., T., Structural modification induced in heparin by a Fenton-type depolymerization process. *Semin. Thromb. Hemost.* **2007**, *33*, (5), 466-477.
315. Wu, M.; Xu, S.; Zhao, J.; Kang, H.; Ding, H., Free-radical depolymerization of glycosaminoglycan from sea cucumber *Thelenata ananas* by hydrogen peroxide and copper ions. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, (4), 1116-1124.
316. Uchiyama, H.; Dobashi, Y.; Ohkouchi, K.; Nagasawa, K., Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7753-7759.
317. Hanefeld, M.; Schaper, F., Acarbose: oral anti-diabetes drug with additional cardiovascular benefits. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2009**, *7*, (3), 330.
318. Szekalska, M.; Puciłowska, A.; Szymańska, E.; Ciosek, P.; Winnicka, K., Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Int. J. Polym. Sc.* **2016**, *2016*, 1-17.
319. Lee, K. Y.; Mooney, D. J., Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, (1), 106-126.
320. Ikeda, A.; Takemura, A.; Ono, H., Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42*, (4), 421-425.
321. Gregor, J. E.; Fenton, E.; Brokenshire, G.; Van Den Brink, P.; O'Sullivan, B., Interactions of calcium and aluminium ions with alginate. *Water Res.* **1996**, *30*, (6), 1319-1324.
322. Thuy, T. T. T.; Van, T. T. T.; Hidekazu, Y.; Hiroshi, U., Fucoidan from Vietnam *Sargassum swartzii*: Isolation, Characterization and Complexation with Bovine Serum Albumin. *Asian J. Chem.* **2012**, *24*, (8), 3367-3370.
323. Theisen, A.; Johann, C.; Deacon, M.; Harding, S., *Refractive Increment Data-book for Polymer and Biomolecular Scientists*. Nottingham University Press: 2000.
324. Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D., MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 101-113.
325. Sprokholt, J. K.; Hertoghs, N.; Geijtenbeek, T. B. H., Flow Cytometry-Based Bead-Binding Assay for Measuring Receptor Ligand Specificity. In *Toll-Like Receptors*, Science, S., Ed. Humana Press: 2016; Vol. 1390, pp 121-129.
326. Rajarathnam, K.; Rösger, J., Isothermal Titration Calorimetry of Membrane Proteins – Progress and Challenges. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 1-21.
327. Zhang, X. L.; Liu, Y.; Fan, F.; Hu, N.; Yang, Z.; Chen, X.; Wang, Z. Y.; Yang, J., Design and Performance of a Portable and Multichannel SPR Device. *Sensors* **2017**, *17*, (6), 1435.
328. Poole, C. F.; Poole, S. K., Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 2268–2286.

- 
329. Patel, D.; Lee, J., Applications of Ionic Liquids. *Chem. Rec.* **2012**, 12, 329–355.
330. Sheldon, R., Catalytic reactions in ionic liquids. *Chem. Comm.* **2001**, 23, 2399–2407.
331. Murugesan, S.; Wiencek, J. M.; Ren, R. X.; Linhardt, R. J., Benzoate-based room temperature ionic liquids—thermal properties and glycosaminoglycan dissolution. *Carbohydrate polymers* **2006**, 63, (2), 268–271.
332. Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D., Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4974–4975.
333. Carlin, R. T.; De Long, H. C.; Fuller, J.; Trulove, P. C., Dual Intercalating Molten Electrolyte Batteries. *J. Electrochem. Soc.* **1994**, 141, 73.





---

## **Fractions polysaccharidiques bioactives extraites de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* pour le diagnostic et la thérapeutique de pathologies cardiovasculaires : caractérisations et optimisation du procédé**

---

### **Résumé**

Les fucoïdanes, des polysaccharides sulfatés extraits d'algues brunes, ont un fort potentiel en santé humaine notamment en nanomédecine. Ils possèdent de nombreuses activités biologiques dont la faculté de se lier à la P-sélectine, un biomarqueur de l'activation endothéliale et plaquettaire, ce qui a conduit au développement par le LVTS d'un agent de contraste pour l'imagerie moléculaire en scintigraphie de l'athérombose. Dans le but d'emmener en phase clinique cet outil diagnostique, nous avons sécurisé la production d'un fucoïdane de bas poids moléculaire extrait d'*Ascophyllum nodosum* et commercialisé sous le nom d'Ascophyscient® par la société Algues & Mer. Par la suite, nous avons optimisé des techniques de purification afin de produire un fucoïdane de grade pharmaceutique pour débiter les études cliniques de l'agent de contraste. Dans un deuxième temps, le fractionnement d'Ascophyscient® par chromatographie d'échange d'ions a permis d'obtenir deux fractions : IEC1 riche en alginates et IEC2 composée quasi uniquement de fucoïdane sulfaté. Ces fractions ainsi que le composé de départ ont été modifiés chimiquement et fixés covalamment à la surface de puces SPR et SAW pour étudier leurs affinités pour les sélectines et le VEGF et ainsi isoler les espèces macromoléculaires bioactives présentes dans Ascophyscient®.

Mots-clés : fucoïdane, athérombose, SPR, SAW, électrogreffage, sélectines.

---

## **Bioactive polysaccharide fractions extracted from the brown algae *Ascophyllum nodosum* for the diagnosis and treatment of cardiovascular pathologies: characterization and optimization of the process**

---

### **Abstract**

Fucoidans, sulfated polysaccharides extracted from brown algae, have a high potential in human health especially in nanomedicine. They possess numerous bioactivities including the ability to strongly bind to P-selectin, a biomarker of endothelial and platelet activation, leading to the development by the LVTS of a contrast agent for the molecular imaging in scintigraphy of atherothrombosis. In order to bring this diagnostic tool into clinical phase, we have secured the production of a low molecular weight fucoidan extracted from *Ascophyllum nodosum* and commercialized as Ascophyscient® by Algues & Mer Company. Then, we have optimized purification technics to produce a pharmaceutical grade fucoidan to start the clinical studies of the contrast agent. In a second time, the fractionation of Ascophyscient® by ions exchange chromatography has resulted in two fractions: IEC1 rich in alginates and IEC2 composed mainly of sulfated fucose. These fractions and the starting compound have been chemically modified and covalently fixed on SPR and SAW sensorchips's surfaces to study their affinities for selectins and VEGF and to isolate bioactive macromolecular species from Ascophyscient®.

Keywords : fucoidan, atherothrombosis, SPR, SAW, electrografting, selectins.