

◆ PROPRIETES ANTICOAGULANTES DES FUCANES SULFATES DES ALGUES
BRUNES

V.GRAUFFEL , S. MABEAU, B. KLOAREG et J.JOSEFONVICZ

RAPPORT DE FIN DE CONTRAT, n°- 84/7591

PROPRIETES ANTICOAGULANTES DES FUCANES SULFATES DES ALGUES BRUNES

V. Grauffel (1,2), S. Mabeau(1), B. Kloareg(1) et J. Josefowicz(2)

INTRODUCTION

Les mucilages sulfatés des algues brunes constituent une famille hétérogène de polymères à base de L-fucose, dont la composition varie de manière continue depuis des molécules riches en fucose et en sulfate vers des molécules plus pauvres en fucose mais renfermant d'importantes proportions de galactose, ou vers des molécules faiblement sulfurylées mais riches en restes uroniques (Tableau I). Ils se répartissent en trois fractions principales, les fucoïdanes, les ascophyllanes et les glucuronofucogalactanes. Ces trois fractions, peuvent chacune être conçue comme l'une des extrémités du diagramme de variabilité défini plus haut. Elles sont vraisemblablement présentes, ainsi que les molécules intermédiaires, en même temps dans le mucilage du thalle. Mais leurs proportions relatives varient avec l'espèce, avec la nature végétative, reproductrice, etc... des tissus étudiés.

Comme de nombreux autres polysides sulfatés, les fucanes possèdent une activité anticoagulante notable. Certaines fractions présentent même une activité supérieure à celle de l'héparine dans le test d'inhibition de la transformation du fibrinogène en fibrine (temps de thrombine, tableau II).

En France, ces propriétés n'avaient fait l'objet d'aucune étude approfondie. Dans ce rapport, nous décrivons le fractionnement des fucanes de Pelvetia canaliculata, Fucus vesiculosus, Sargassum muticum et Laminaria digitata et les premiers résultats de l'étude de leurs propriétés anticoagulantes (MABEAU, 1985 ; GRAUFFEL, 1985).

(1) Centre d'Etudes Océanologiques et de Biologie Marine CNRS (LP 4601) 29211 Roscoff

(2) Laboratoire de Recherche sur les Macromolécules, UA 502, Université Paris XII, 93430 Villetaneuse.

Tableau I . Distribution et importance relative des fucanes des Phéophycées (KLOAREG, 1984)

Ordre	Genre	xylo- galacto fucanes (fucoidanes)	xylofuco glucurona- nes (ascophyllanes)	glucurono fucogalac- tanes	Références
Ectocarpales	<u>Ectocarpus</u>		+(traces)		34
	<u>Sporocarpus</u>	+	+		27,2
Chordariales	<u>Heterochordaria</u>	++			27
	<u>Laethesia</u>	++			27
	<u>Nemacystus</u>	++			27,28
	<u>Sphaerotrichia</u>	++			27
	<u>Tinocladia</u>	++			27
Desmarestiales	<u>Desmarestia</u>	+	+	++	24,33
Dictyosopbonales	<u>Asperococcus</u>			+	2
Scytosiphonales	<u>Colpomenia</u>			++	29
	<u>Scytosiphon</u>	+	+		27
Sphacelariales	<u>Stypocaulon</u>			+	2
Dictyotales	<u>Dictyopteris</u>	+	++		39
	<u>Dictyota</u>		++	+	2,32,36
	<u>Padina</u>	+	++	+	2,20,22,27,37
	<u>Taonia</u>			+	2
Laminariales	<u>Alaria (thalle)</u>		+	+	27
	<u>Alaria (sporophylles)</u>			++	27
	<u>Chorda</u>	++		+	2
	<u>Eklonia</u>	+			1
	<u>Eisenia</u>	++	+		27,38
	<u>Kjellmaniella</u>	++	++		27,44,45,46
	<u>Laminaria</u>	++			2,27
	<u>Lessonia</u>	++	+		30,43
	<u>Macrocystis</u>	++			4
	<u>Nereocystis</u>	++			40
	<u>Undaria (thalle)</u>		+	+	26
	<u>Undaria (sporophylles)</u>			++	17,42
Fucales	<u>Ascophyllum</u>	+	++	+	2,5,6,8-10, 12,14,18,31,35
	<u>Bifurcaria</u>	+	+		2,20,22
	<u>Fucus</u>	+	+		3,14,27,31
	<u>Halidrys</u>	+			2
	<u>Himanthalia</u>	+	+		20,22
	<u>Hizikia</u>		++		27
	<u>Pelvetia</u>	++	+		2,7,11,16, 19,25,27.
	<u>Sargassum</u>		+	++	15,21,23
	<u>Turbinaria</u>	+	++		41

+ présent ; ++ abondant

Références : 1-Stewart et Higgins, 1960 ; 2-Quillet, 1961 ; 3-Bernardi et Springer, 1962 ; 4a,b-Schweiger, 1962 ; 5a,b-Larsen et Haug, 1963 ; 6a,b-Larsen et Haug, 1966 ; 7-Anno et al., 1966 ; 8-Larsen, 1967 ; 9-Percival, 1967 ; 10-Percival, 1968 ; 11-Anno et al., 1969 ; 12-Larsen et Haug, 1969 ; 13-Madgwick et al., 1969 ; 14-Larsen et al., 1970 ; 15-Ovodov et al., 1970 ; 16-Ovodov et Parlenko, 1970 ; 17-Igarashi et al., 1971 ; 18-Percival, 1971 ; 19-Anno et Uemura, 1971 ; 20-Percival et Jabbar-Mian, 1972 ; 21-Abdel-Fattah et al., 1973 ; 22a,b-Jabbar-Mian et Percival, 1973 ; 23-Abdel-Fattah et al., 1974 ; 24-Percival et Young, 1974 ; 25-Lestang, 1974 ; 26-Fujikawa et al., 1975 ; 27-Fujikawa et Nakashima, 1975 ; 28-Fujikawa et Wada, 1975 ; 29-Hussein, 1975 ; 30-Villaroel et Zanlungo, 1975 ; 31a,b-Medcalf et Larsen, 1977 ; 32-Abdel-Fattah et al., 1978 ; 33-Carlberg et al., 1978 ; 34-Fujikawa et Nakashima, 1978 ; 35-Medcalf et al., 1978 ; 36-Hussein et al., 1979 ; 37a,b-Hussein et al., 1980 ; 38-Usui et al., 1980 ; 39-Percival et al., 1981 ; 40-Whyte et Englar, 1981 ; 41-El-Sayed, 1982 ; 42-Mori et al., 1982 ; 43-Percival et al., 1983.

Espèce	Nature de la fraction testée	Nature du test	Activité	Référence
<i>F. vésiculosus</i>	fucoïdane	temps de coagulation	10-20% héparine	1,2
		temps de recalcification	65-100% héparine	1,2
		temps de thrombine	> héparine	1,2
<i>S. linifolium</i>	glucuronofuco-galactane	temps de coagulation	> héparine	3
<i>D. dichotoma</i>	glucuronoxylo-fucogalactane	temps de coagulation	> héparine	4
<i>E. bicyclis</i>	fucoïdane	temps de coagulation	40% héparine	5
<i>U. pinnatifida</i>	fucogalactane sulfaté	temps de thrombine	200 % héparine	6

TABLEAU 2. Propriétés anticoagulantes des fucanes sulfatés des algues brunes

1: Springer *et al* 1957; 2: Bernardi *et Springer*, 1962; 3: Abdel-Fattah *et al*, 1974;

4: Abdel-Fattah *et al*, 1978; 5: Usui *et Mizuno*, 1980; 6: Mori *et al*, 1982;

I. EXTRACTION, PURIFICATION ET ANALYSE DES FUCANES DE PELVETIA CANALICULATA, SARGASSUM MUTICUM, FUCUS VESICULOSUS ET LAMINARIA DIGITATA.

Le fractionnement des thalles (figure 1) fait apparaître quatre fractions fucanes primaires, les fucanes pariétaux extractibles en milieu acide (FPE), une fraction mixte renfermant des fucanes et des polyuronides (M), les fucanes intercellulaires libres (FL) et les fucanes intercellulaires libérés par le triton (FLT) (Mabeau, 1985).

Les fucanes intercellulaires, FL et FLT, les fucanes pariétaux, FPE, et la fraction mixte, M, ont ensuite été chromatographiés en diverses sous-fractions, indicées par la molarité en chlorure de sodium ayant permis leur élution. Pour les fucanes pariétaux et intercellulaires, on a généralement obtenu trois sous-fractions majoritaires, éluées respectivement par du chlorure de sodium 0,5 M ; 1 M et 1,5 M. Lorsque les fractions éluées par l'eau et par le chlorure de sodium 2 M avaient une masse négligeable, ce qui était le cas général, elles n'ont pas été étudiées. Quand aux fractions mixtes, elles se résolvent en deux fractions principales, une fraction uronique, M 0,3 et une fraction fucane, M 1,5 (figure 2).

La composition chimique détaillée de chacune de ces fractions, primaire ou secondaire, est donnée au tableau III. A l'exception de la fraction M 1,5 ces fractions apparaissent comme des mélanges de macromolécules complexes. Tous ces polymères contiennent en effet, outre le fucose, du xylose, du galactose, des acides hexuroniques, du sulfate et une partie protéique.

Néanmoins, on peut retenir que, globalement, les fucanes des espèces de haut niveau sont plus riches en sulfate et en fucose et moins riches en acides uroniques que les fucanes des espèces de bas niveau. De même, pour une espèce donnée, les fucanes FL et M 1,5 sont plus riches en fucose sulfaté que les fucanes FLT et FPE. On notera de plus que les fucanes FL sont plus riches en galactose que les autres fractions.

Le constituant majoritaire des fucanes libres de Sargassum muticum, FL 1, présente un rapport molaire du fucose au galactose de 1 : 1,05 et contient 7 % d'acides uroniques (tableau 13). Cette fraction présente une composition très proche du glucuronogalactofucane extrait des thalles d'Ascophyllum nodosum par MEDCALF et al. (1978) et est vraisemblablement formé d'une chaîne de résidus

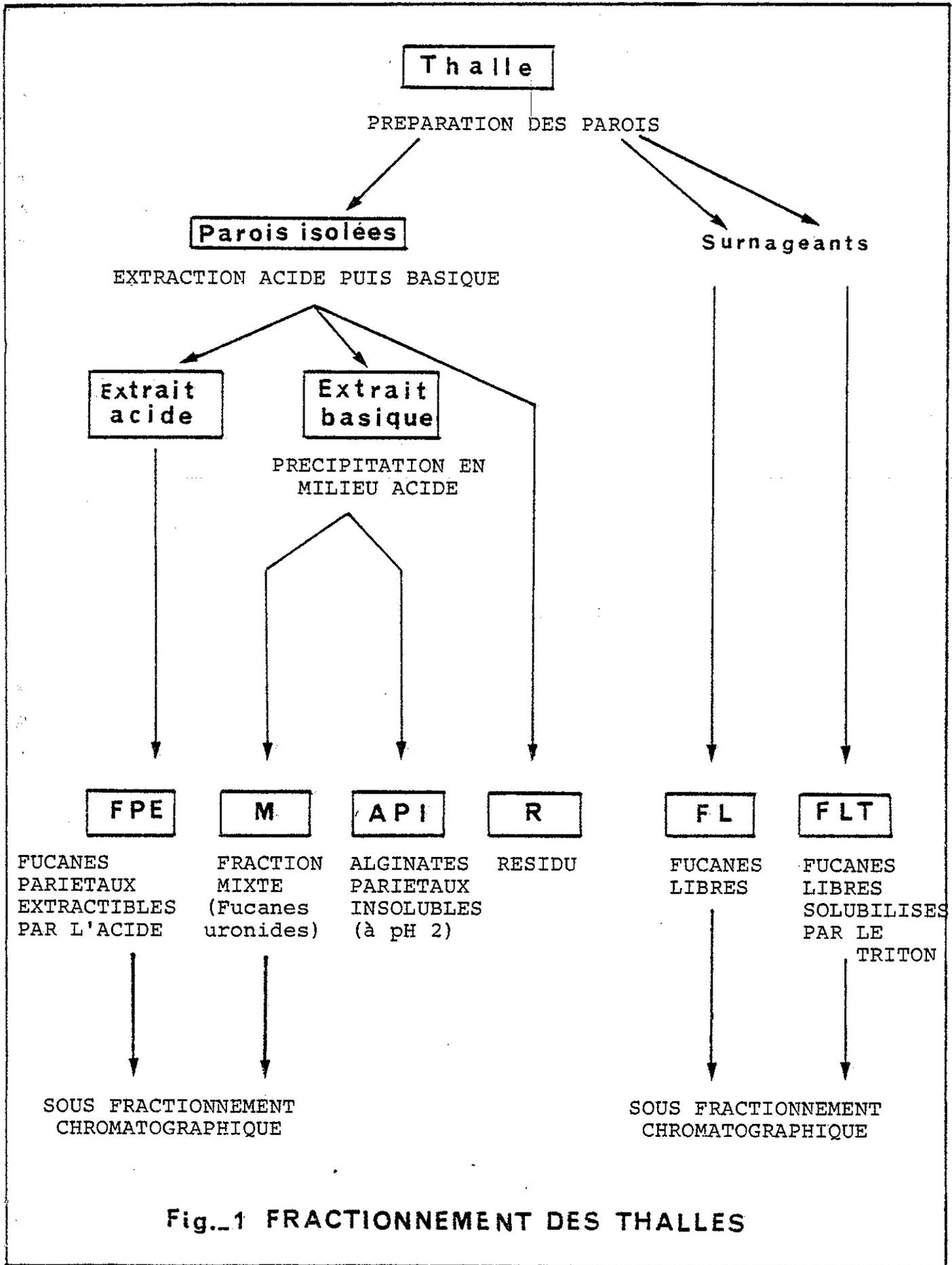


Fig. 1 FRACTIONNEMENT DES THALLES

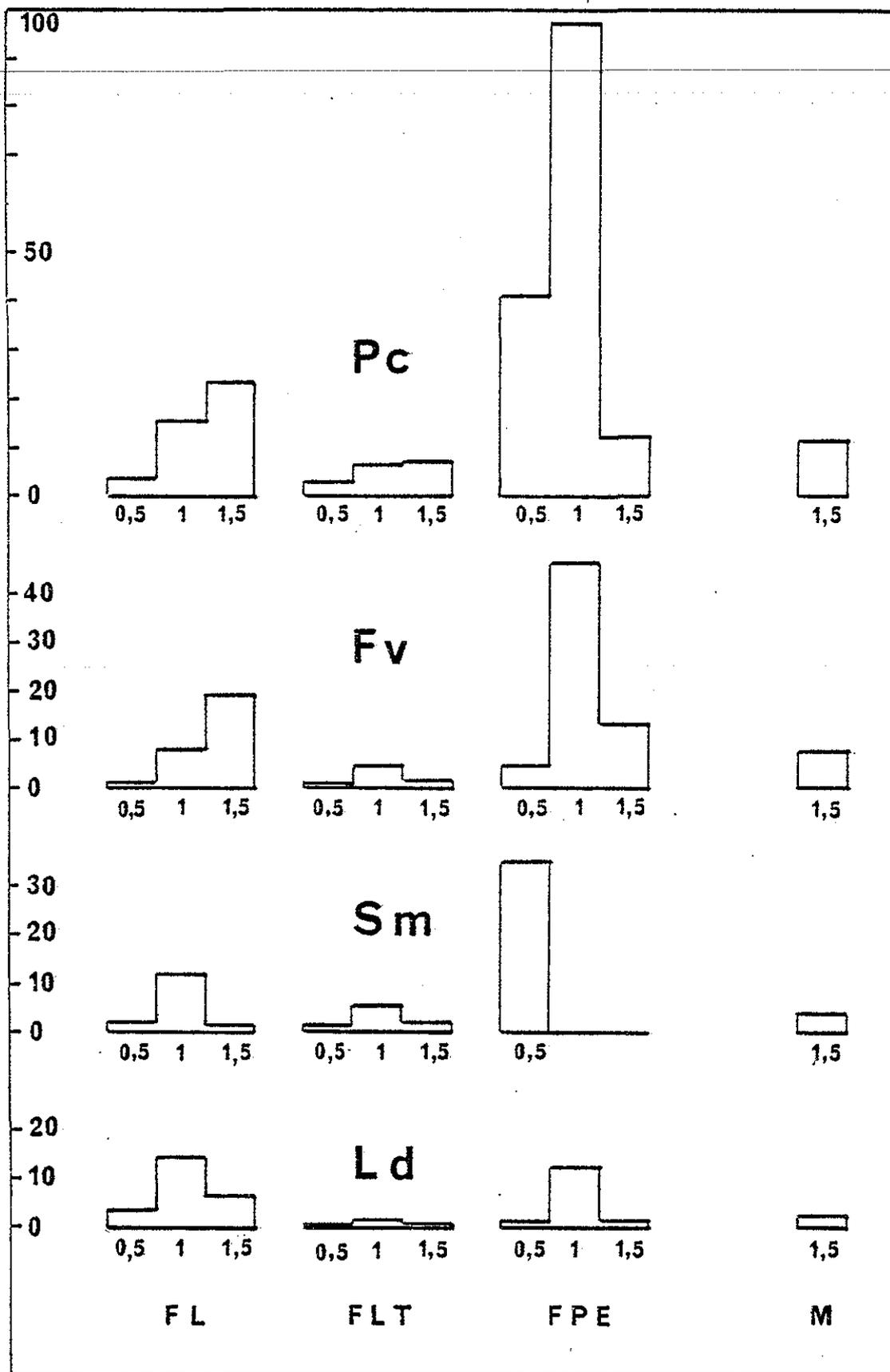


Fig.- 2 : Abondance relative des différentes préfractions et sous-fractions de fucanes de P. canaliculata, F. vesiculosus, S. muticum et L. digitata.
(en milligrammes par gramme de thalle sec).

Echantillon	Rendement du sous-fractionnement (1)	Teneurs (en pourcentages pondéraux)				Composition osidique					Rendement d'hydrolyse
		Fucose	Sulfate	acides uroniques	protéines	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	
FL		33	29	4	3						
FL 0,5	4	13		9							
FL 1	18	30		8		67	8	3	19	3	40
FL 1,5	27	39		1		93	1	1	4	1	67
FLT		26	20	6	8						
FLT 0,5	7	13		14		40	33	11	4	12	24
FLT 1	16	21		11		54	14	8	19	5	26
FLT 1,5	17	38		1		89	3	1	6	1	44
FPE		39	40	8	1,0						
FPE 0,5	16	15		24		73	19	3	4	1	35
FPE 1	38	39		2,2		83	6	1	9	1	37
FPE 1,5	5	40		1,8		88	4	traces	6	2	42
M		13	11	46	2,5	90	4	1	4	1	42
M 1,5	19	32	33	3,7		MannU		GulU		M/G	
M 0,3	35	0,3		67(75)							
API		1		74(89)	1,4	47		53		0,9	54

Tableau 3 a : Analyse chimique des polysides pariétaux et intercellulaires de Pelvetia canaliculata

(1) en pourcentage de la masse du produit de départ

(2) en pourcentage molaire de la totalité des oses neutres dosés

(3) en pourcentage molaire de la totalité des acides uroniques dosés

(4) rapport des oses dosés par CPG ou HPLC à la masse du produit avant hydrolyse

Les teneurs en acides uroniques données entre parenthèses sont corrigées en tenant compte du rapport M/G

Echantillon	Rendement du sous-fractionnement (1)	Teneurs (en pourcentages pondéraux)				Composition osidique					Rendement d'hydrolyse
		Fucose	Sulfate	Acides uroniques	protéines	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	
FL		31	26	4	3						
FL 0,5	3	19		5		64	14	6	11	5	19
FL 1	20	24		4		72	8	1	18	1	37
FL 1,5	49	39		4		89	tr	tr	10	1	45
FLT		18	14	9	4						
FLT 0,5	9	5		7							
FLT 1	41	13		10		53	12	12	16	7	16
FLT 1,5	14	31		3		84	2	1	12	1	
FPE		37	39	17	4						
FPE 0,5	(4)	16	4	24		61	26	4	5	4	23
FPE 1	41	38	32	5		78	11	3	5	3	35
FPE 1,5	2	43		1,8		93	3	tr	4	tr	40
M		14	13	34	10						
M 1,5	19	30	30	5		87	4	2	5	2	34
						MannU		GulU		M/G	
M 0,3	34	0,8		92							
API		0,9		73(89)	2,3	44		56		0,8	64

Tableau 3 b : Analyse chimique des polysides pariétaux et intercellulaires de Fucus vesiculosus (notations identiques à celles du Tableau 3a).

Echantillon	Rendement du sous-fractionnement (1)	Teneurs (en pourcentages pondéraux)				Composition osidique					Rendement d'hydrolyse
		Fucose	Sulfate	acides uroniques	protéines	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	
FL		18	12	9	6						
FL 0,5	8	12		14							
FL 1	47	23	23	7		44	5	2	46	3	41
FL 1,5	6	7		5							
FLT		13	8	11	4						
FLT 0,5	9	12		19							
FLT 1	31	15	20	13		84	2	tr	14	tr	22
FLT 1,5	11	4		4							
FPE		19	9	25	3						
FPE 0,5	71	24		37		46	21	17	11	5	
M											
M 11	11	45	9								
M 1,5	19										
M 0,3	38	0,7		70		MannU		GulU		M/G	
API		0,5		71(88)	3	41		59		0,7	74

Tableau 3c : Analyse chimique des polysides pariétaux et intercellulaires de Sargassum muticum.
(notations identiques à celles du Tableau 3a).

Echantillon	Rendement du sous-fractionnement (1)	Teneurs (pourcentages pondéraux)				Composition osidique					Rendement d'hydrolyse
		Fucose	Sulfate	acides uroniques	protéines	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	
FL		19	18	7	8						
FL 0,5	6	13	3	12		62	15	10	6	7	38
FL 1	26	24	25	8		64	5	5	22	4	38
FL 1,5	12	26		4		67	1	1	30	1	44
FLT		15	11	12	7						
FLT 0,5	18	8		14							
FLT 1	42	14		15		47	15	11	20	7	23
FLT 1,5	16	16		5							
FPE		19	11	20	4						
FPE 0	4	8		20		46	9	10	9	26	15
FPE 0,5	36	12		21		49	20	7	20	4	20
FPE 1	4	15		11							
M		9	10	37	6						
M 1,5	19	33		4		58 MannU	19	5 GulU	16	2 M/G	
M 0,3	22	2		67							
API		0,4		78(88)	2	64		36		1,8	52

Tableau 3d : Analyse chimique des polysides pariétaux et intercellulaires de Laminaria digitata.
(notations identiques à celles du Tableau 3a).

galactosyl sur laquelle sont branchés des monomères fucosyl-sulfate ou des monomères glucuronosyl (MEDCALF et al., 1978). Parmi les espèces que nous avons étudiées, Sargassum muticum semble la seule à renfermer des quantités importantes de ce type de fucanes.

II. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTITHROMBINE DES FUCANES DE PELVETIA CANALICULATA, SARGASSUM MUTICUM, FUCUS VESICULOSUS ET LAMINARIA DIGITATA

A) Mise en évidence de l'activité antithrombique

1) Protocole expérimental

Le test choisi est le temps de thrombine, c'est-à-dire le temps au bout duquel apparaît un caillot dans un plasma additionné de thrombine. Une augmentation du temps de thrombine par rapport au témoin implique une perturbation de la phase finale de la coagulation, la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble.

A 0,2 ml de plasma pauvre en plaquettes on ajoute 0,1 ml d'une solution de fucane dans du tampon de Michaelis. Le mélange est incubé 1 min. à 37°C puis l'on ajoute 0,7 ml d'une solution de thrombine à 15 unités ml⁻¹. Le temps de thrombine est alors mesuré à l'aide d'un coagulomètre KC1-DODE, en fonction de la concentration finale en fucane et sur un témoin dépourvu de polymère. Parallèlement, on établit une gamme d'étalonnage donnant le temps de thrombine en fonction de la concentration initiale de thrombine. Cette courbe étalon permet de déduire le taux de thrombine inactivée, T_i , (en unités National Institute of Health par millilitre) pour chaque concentration C du polymère. La courbe $T_i = f(C)$, caractéristique de l'activité du polymère, présente alors toujours la même allure : une partie linéaire où le taux de thrombine inactivée est proportionnel à la concentration en polymère et un plateau de saturation ayant comme asymptote une parallèle à l'axe des abscisses qui correspond pratiquement à la concentration initiale de thrombine. Si Y désigne l'ordonnée de l'asymptote et X l'abscisse correspondant à $Y/2$, l'activité du polymère étudié est prise égale à $Y/2X$ (en UNIH. mg⁻¹).

2) Résultats

L'activité antithrombique des diverses fractions testées est donnée au tableau IV. La comparaison des tableaux III et IV montre que l'activité antithrombique varie dans le même sens que les teneurs en fucose et en sulfate des échantillons testés. Une étude de fractions secondaires correspondant aux échantillons étudiés ou de fucanes enrichis en fucose et en sulfate par un autre procédé de fractionnement apparaît toutefois nécessaire pour confirmer cette règle.

Les fractions les plus actives présentent une activité antithrombique de 350 à 400 UNIH. mg⁻¹, soit environ 10 % de celle d'une héparine de référence (Héparine H 108 du CNTS). Elle est du même ordre de grandeur que l'activité des dextrans sulfatés (MANZAC, 1984) ou de certains xylanes sulfatés du commerce mais est très inférieure à l'activité de certaines fractions purifiées répertoriées au tableau II.

B) Mise en évidence du caractère "Héparine-like" du mécanisme anticoagulant

Nous avons vérifié à l'aide du test "temps de reptilase" (MAUZAC, 1984) que l'activité anticoagulante des fucanes sulfatés n'est pas simplement due à une altération du fibrinogène par le polymère. Trois types d'interactions peuvent alors exister entre le polymère (P), la thrombine (T) et l'antithrombine (AT).



où T* désigne la thrombine inactivée.

L'étude de la cinétique de ces trois réactions (figure 3) montre que l'inactivation de la thrombine par l'antithrombine est très favorisée par la présence de fucanes sulfatés. Ces polymères possèdent donc un caractère "héparine-like", c'est à dire catalysent l'inactivation de la thrombine par l'antithrombine.

Fractions				
Espèce	FL	FLT	FPE	M
<i>P. canaliculata</i>	344	197	350	94
<i>S. muticum</i>	20	11	93	32
<i>F. vésiculosus</i>	360	91	350-400	240
<i>L. digitata</i>	183	ND	21	28

TABLEAU 4. Activité antithrombique des diverses fractions testées, en unités NIH. mg⁻¹ (Grauffel; 1985)

CONCLUSION

Ces premiers résultats indiquent que ce sont les fractions de type fucoïdane qui possèdent l'activité la plus élevée, environ 10 % de celle de l'héparine (V. Grauffel, 1985). Ces fucanes sont des homopolymères très sulfatés à base de (1-2)-L-fucose-4-sulfate. Ils sont particulièrement abondants chez les espèces de haut niveau telles que Pelvetia canaliculata ou Fucus vesiculosus mais Laminaria digitata en renferme également des proportions notables, de 2 à 5 % de la masse sèche environ.

Une étude plus détaillée de l'un des échantillons testés montre que les fucoïdanes ont un caractère "héparine-like" vis à vis de la thrombine : ils catalysent la réaction d'inhibition de la thrombine par l'antithrombine III.

Ces travaux méritent d'être approfondis dans trois directions :

- rechercher ou fabriquer des fractions à plus fort pouvoir anticoagulant, par exemple en fractionnant leur masse à l'aide d'enzymes spécifiques.
- définir plus précisément le mécanisme d'action des fucoïdanes sur la coagulation.
- étudier un mode de préparation basé sur la récupération des polymères au cours du processus d'extraction industrielle des alginates de Laminaria digitata.

REFERENCES

ABDEL-FATTAH, HUSSEIN, M. M-D. & SALEN, H.M., 1974 - Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from Sargassum linifolium. Carbohydr. Res., 33, 9-17.

ABDEL-FATTAH, A.F., HUSSEIN, M.M. & FOUAD, S.T., 1978 - Carbohydrates of the brown seaweed Dictyota dichotoma. Phytochem., 17, 741-743.

BERNARDI, G., SPRINGER, G.F., 1962 - Properties of highly purified fucan. J. Biol. Chem., 237, 75-80.

GRAUFFEL, V., 1985 - Etude des propriétés anticoagulantes des fucanes sulfatés des Algues Brunes. Thèse de Pharmacie (Spécialité) Université PARIS V.

KLOAREG, B., 1984 - Composition chimique et propriétés d'échange des parois cellulaires des Algues Brunes. Thèse Doct. (Etat), Université de Bretagne Occidentale, Brest, 258 p.

MABEAU, S., 1985 - Contribution à l'étude de la structure et des fonctions de la paroi des Algues Brunes. Thèse (Doct. Ing.) Institut National Agronomique, Grignon, 107 p.

MAUZAC, M., 1984 - Préparation et activité biologique de dérivés du dextrane. Thèse Doct (Etat), Université Paris Nord, 123 p.

MORI, H., KAMEI, H., NISHIDE, E. & NISIZAWA, K., 1982 - Sugar constituents of some sulfated polysaccharides from the sporophylls of wakame (Undaria pinnatifida) and their biological activities.

SPRINGER, G.F., WURZEL, H.A., Mc NEAL, G.M., ANSELL, N.J. & DOUGHTY, M.F., 1957 - Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin.

USUI, T., ASARI, K. & MIZUNO, T., 1980 - Isolation of highly purified fucoidan from Eisenia bicyclis and its anticoagulant and antitumor activity. Agric. Biol. Chem., 44, 1965-1966.