

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N°598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : *Biologie, Biochimie Cellulaire et Moléculaire*

Par

Josiane ELIA

**Fractionnement bioguidé de *Laurencia papillosa* de la côte libanaise :
identification du cholest-4-èn-3-one, un nouvel agoniste de LXR
cytotoxique pour les cellules du cancer du sein**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 7 Mars 2019

Unité de recherche : EA 2160 - MMS - UFR Sciences Biologiques et Pharmaceutiques

Rapporteurs avant soutenance :

Laetitia Delort Maître de conférences, HDR, Université d'Auvergne
Erwan Ar Gall Maître de conférences, HDR, Université de Bretagne Occidentale de Brest

Composition du Jury :

Président : Joël Boustie Professeur, Université de Rennes 1
Examinatrice : Mona Tannoury Professeur, Université Libanaise
Directeur de thèse : Hassan Nazih Maître de conférences, HDR, Université de Nantes
Co-directrice de thèse : Mona Diab-Assaf Professeur, Université Libanaise

Invités :

Delphine Carbonnelle Maître de conférences, Université de Nantes
Karina Petit Maître de conférences, Université de Nantes

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donnée le courage, la force et la patience d'accomplir ce travail.

Je suis reconnaissante aux nombreuses personnes qui ont rendu possible la réalisation de cette thèse.

Je tiens d'abord à exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, Dr. Hassan Nazih, pour m'avoir fait confiance, accueillie au sein de son laboratoire, guidée, encouragée et conseillée tout au long de ces années de thèse.

Un grand merci à ma co-directrice Pr. Mona Diab-Assaf et ma co-encadrant Pr. Mona Tannoury au Liban qui m'ont offert l'opportunité d'effectuer une thèse sur un sujet qui me tenait à cœur, je vous en serai éternellement reconnaissante. Merci de m'avoir conseillée et motivée tout au long de ces années d'études.

Mes remerciements s'adressent également à mes encadrants en France, Dr. Delphine Carbonnelle et Dr. Karina Petit, pour leur rôle efficace dans l'orientation du projet de thèse, ainsi que pour leur gentillesse, leur compréhension, leur confiance et leurs conseils avisés. J'ai beaucoup appris de vous et je tiens aussi à vous remercier pour votre soutien personnel et académique.

Je voudrais remercier les rapporteurs, Dr. Laetitia Delort et Dr. Erwan Ar Gall, ainsi que les membres du jury Pr. Joël Boustie et Pr. Mona Tannoury qui ont aimablement accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens également à remercier le directeur de laboratoire « Mer Molécules Santé » Pr. Yves François Pouchus de m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Mes remerciements vont également aux membres du comité de suivi de la thèse, Pr. Nathalie Bourgougnon et Dr. Jean-Pierre Segain, pour leur soutien et leurs conseils.

Je remercie aussi tout spécialement Dr. Gaëtane Wielgosz-Collin et Dr. Aurélie Couzinet-Mossion pour leur aide dans l'analyse des lipides par CPG/SM.

Je voudrais aussi remercier les techniciens de laboratoire, Marie-Claude Boumard, Aurore Michaud, Vony Rabesaotra et Jean-Michel Huvelin, pour leurs conseils et leur soutien technique.

Merci également aux doctorants, sans oublier ma stagiaire Manon dont je suis heureuse d'avoir fait la connaissance.

Plus personnellement, je n'oublierai pas de remercier mon meilleur ami Elie pour ses encouragements et son soutien quotidien.

Merci infiniment à ma sœur et à mes deux frères, que j'aime tant et qui m'ont encouragée tout au long de ma vie et de mes études.

Enfin et tout spécialement, je tiens à remercier de tout mon cœur mes parents pour tout le bien qu'ils m'ont fait et pour tout le bonheur qu'ils m'ont donné, cela m'encourage et me donne la force de persévérer et de continuer à croire en l'avenir. Ce travail de thèse vous est entièrement dédié. Je vous dois tout.

Sommaire

Sommaire	i
Valorisation des travaux de thèse.....	v
Liste des abréviations.....	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux.....	xiii
Introduction générale	1
Chapitre I. Etude bibliographique	3
1. Métabolisme des lipides et cancer	4
1.1. Cancer du sein.....	4
1.2. Biosynthèse des acides gras et cancer	4
1.2.1. Voie de la biosynthèse des acides gras.....	5
1.2.2. Biosynthèse aberrante des acides gras dans le cancer.....	6
1.2.3. Molécules ciblant les enzymes de la lipogenèse dans le cancer	8
1.2.4. Régulateurs de la biosynthèse des acides gras.....	10
1.3. Biosynthèse du cholestérol et cancer	17
1.3.1. Rôle du cholestérol dans le cancer	17
1.3.2. Voie de la biosynthèse du cholestérol	18
1.3.3. Biosynthèse aberrante du cholestérol dans le cancer	19
1.3.4. Molécules ciblant l'enzyme de biosynthèse du cholestérol dans le cancer	20
1.3.5. Régulateurs de la biosynthèse du cholestérol	20
1.4. Radeaux lipidiques et cancer	23
1.4.1. Régulation des voies de signalisation par les radeaux lipidiques	24

1.4.2. Rôle de la flotilline dans le cancer	26
1.4.3. Molécules ciblant les radeaux lipidiques dans le cancer	27
2. Approche bioguidée	30
3. Le milieu marin, source de composés originaux et bioactifs	33
4. Les macroalgues marines	34
4.1. Caractéristiques générales	34
4.2. Composition biochimique	35
4.3. Activité cytotoxique des macroalgues marines	36
4.4. Etat de l'art des connaissances sur les macroalgues marines de la côte libanaise	39
4.5. Le genre <i>Laurencia</i>	39
5. Les lipides des macroalgues marines	50
5.1. Les lipides : généralités	50
5.2. Les lipides d'algues marines	50
5.3. Composition lipidique d'algues	51
5.3.1. Les lipides neutres	51
5.3.2. Les glycolipides	52
5.3.3. Les phospholipides	53
5.3.4. Les sphingolipides	55
5.3.5. Les acides gras	55
5.4. Les lipides des macroalgues marines rouges	58
Chapitre II. Etude de composés cytotoxiques de <i>Laurencia papillosa</i>	60
Préambule	61
1. Partie expérimentale	62
1.1. Traitement préalable de la biomasse végétale	62

1.2. Extraction solide-liquide	62
1.3. Méthodes chromatographiques appliquées au fractionnement bioguidé.....	63
1.3.1. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	63
1.3.2. La Chromatographie Liquide sur Colonne ouverte (CLC).....	64
1.3.3. La chromatographie Liquide sous Vide (CLV).....	64
1.3.4. La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP).....	64
1.4. Méthodes spectroscopiques.....	66
1.4.1. UPLC-HRMS-IT-TOF	66
1.4.2. Traitement des données	67
1.5. Tests biologiques.....	67
1.5.1. Lignée cellulaire et condition de culture.....	67
1.5.2. Test de cytotoxicité MTT.....	68
1.5.3. Test annexine V/ iodure de propidium	68
1.5.4. RT-qPCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).....	68
1.5.5. Western blot	69
2. Résultats.....	69
2.1. Analyse du premier lot.....	69
2.1.1. Présentation de la publication	70
2.1.2. Conclusion.....	86
2.2. Analyse du second lot	87
2.2.1. Obtention de l'extrait brut.....	87
2.2.2. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait brut.....	87
2.2.3. Fractionnement bioguidé de l'extrait algal.....	87
2.2.4. Discussion.....	102
3. Conclusion.....	103

Chapitre III. Etude de la composition lipidique de <i>Laurencia papillosa</i>	105
1. Contexte de l'étude.....	106
2. Présentation de la publication	107
3. Conclusion.....	121
Chapitre IV. Cytotoxicité du cholest-4-èn-3-one, un nouvel agoniste de LXR, dans les cellules du cancer du sein.....	122
1. Contexte de l'étude.....	123
2. Présentation de la publication	124
3. Conclusion.....	146
Conclusion générale et perspectives	148
Références bibliographiques	154
Annexes.....	183
Annexe 1. Métabolites cytotoxiques des macroalgues marines du genre <i>Laurencia</i>	183
Annexe 2. Chromatogramme UPLC-HRMS-IT-TOF de la fraction acétonique F9	211
Annexe 3. Liste des pics <i>m/z</i> de la sous-fraction F25.18	212
Annexe 4. Méthodologie d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)	215

Valorisation des travaux de thèse

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications affichées suivantes :

- Publications

Article sous presse : Josiane Elia, Karina Petit, Jean-Michel Huvelin, Mona Tannoury, Mona Diab-Assaf, Delphine Carbonnelle and Hassan Nazih. Acetone Fraction of the Red Marine Alga *Laurencia papillosa* Reduces the Expression of Bcl-2 Anti-apoptotic Marker and Flotillin-2 Lipid Raft Marker in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (impact factor en 2017 = 1,352).

Article soumis (février 2019) : Josiane Elia, Karina Petit, Gaëtane Wielgosz-Collin, Aurélie Couzinet-Mossion, Mona Tannour, Mona Diab-Assaf, Delphine Carbonnelle and Hassan Nazih. Lipid composition of the red marine macroalga *Laurencia papillosa* of the Lebanese coast and its cytotoxic activity. *Marine Drugs* (impact factor en 2017 = 3,503).

Article soumis (décembre 2018) : Josiane Elia, Delphine Carbonnelle, Jean-Michel Huvelin, Alexandra Burghilea, Mona Tannoury, Mona Diab-Assaf, Karina Petit, Hassan Nazih. 4-cholesten-3-one is an LXR agonist that decreases breast cancer cell growth by reducing lipogenesis and membrane raft-localized EGFR and enhancing transporter-induced cholesterol efflux. *Cellular Oncology* (impact factor en 2017 = 3,786).

- Communications affichées

Josiane Elia, Karina Petit, Mona Tannoury, Mona Diab-Assaf, Huyen Trang Luu, Jean-Michel Huvelin, Delphine Carbonnelle, Hassan Nazih. « Search for antiproliferative and apoptotic compounds from the Lebanese red algae *Laurencia papillosa* ». 6^{ème} congrès de l'ISAP (International Society for Applied Phycology), 18-23 juin 2017, Cité des Congrès, Nantes, France.

Josiane Elia, Karina Petit, Mona Tannoury, Mona Diab-Assaf, Delphine Carbonnelle, Hassan Nazih. « Isolation of anti-proliferative and pro-apoptotic compounds from red macroalgae *Laurencia papillosa* by bioguided fractionation ». 5^{èmes} journées internationales de l'AFERP (Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie), 17-19 juillet 2017, Université d'Angers, France.

Josiane Elia, Karina Petit, Gaëtane Wielgosz-Collin, Aurélie Couzinet-Mossion, Mona Tannoury, Mona Diab-Assaf, Delphine Carbonnelle, Hassan Nazih. « Lipid characterization of the red alga *Laurencia papillosa* and biological evaluation ». 3^{ème} symposium international AFERP-STOLON, 18-20 juillet 2018, Université de Rennes, France.

Josiane Elia, Delphine Carbonnelle, Clémentine Gaudin, Jean-Michel Huvelin, Alexandra Burghilea, Mona Tannoury, Mona Diab-Assaf, Karina Petit, Hassan Nazih. « L'effet antiprolifératif du cholest-4-en-3-one, un métabolite du microbiote intestinal, est associé à une diminution de la lipogenèse et à une désorganisation des radeaux lipidiques dans deux modèles de cellules cancéreuses mammaires ». Les Journées Francophones de Nutrition, 28-30 novembre 2018, Palais des Congrès Acropolis, Nice, France.

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
ABC	ATP-Binding Cassette transporter
ABCA1	ATP-Binding Cassette sub-family A member 1
ABCG1	ATP-Binding Cassette sub-family G member 1
ACC	Acétyl- CoA Carboxylase
ACL ou ACLY	ATP Citrate Lyase
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGS	Acide gras saturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AKT	Protéine kinase B
ALA	Acide α -linoléique
ApoA-I	Apolipoprotéine A-I
APOE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
Cdk	Cyclin dependent kinase
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CI₅₀	Concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CoA	Co-enzyme A
CTRL	Contrôle
DHA	Acide docosahexaénoïque
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
ED₅₀	Dose Efficace pour 50% de la population
ER	Récepteurs d'œstrogènes
EGCG	Gallate d'épigallocatechine

EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMAG	Esters Méthyliques d'Acide Gras
EPA	Acide eicosapentaéoiïque
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2
ESI	Electrospray
F	Fraction
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FASN	Fatty Acid Synthase
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
CPG/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GI₅₀	Inhibition de la croissance de 50% des cellules
GL	Glycolipide
HER1 ou 2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 1 or 2
HDL	High Density Lipoprotein
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A
HMGCR	3-Hydroxy-3-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A Réductase
HMGCS1	Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A Synthase 1
H₂O	Eau
ID₅₀	Concentration minimale pour une inhibition de 50%
IDOL	Inducible Degradier Of LDLR
INSIG	Insulin-induced gene
IP	Iodure de propidium
LA	Acide linoléique
LC₅₀	Concentration du composé létale pour 50% de la population exposée
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LN	Lipide neutre
LXR	Liver X Receptor
<i>m/z</i>	masse/charge
MeOH	Méthanol

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
MMP	Matrix Metalloproteinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
MTT	bromure de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphényl Tétrazolium
NAP	N-Acyl Pyrrolidide
Na₂SO₄	Sulfate de sodium anhydre
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PL	Phospholipide
PS	Phosphatidylsérine
Rb	Rétinoblastome
RT-qPCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoid X receptor
SCAP	SREBP Cleavage-Activating Protein
SCD1	Stéaroyl-CoA désaturase 1
siRNA	small interfering RNA
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
TG ou TAG	Triglycérides ou Triacylglycérols
TRAIL	Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
UPLC-HRMS-IT-TOF	Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry Ion Trap Time of Flight
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique des voies impliquées dans la lipogenèse (Mounier, Bouraoui, and Rassart 2014)	6
Figure 2. Principaux mécanismes d'action des produits pharmaceutiques inhibant le métabolisme des lipides dans les cellules cancéreuses (Liu <i>et al.</i> 2017)	8
Figure 3. Activation protéolytique de SREBP (Moon 2017)	10
Figure 4. Régulation de l'activité de SREBP par la voie PI3K/AKT/mTORC1 dans le cancer (Mullen <i>et al.</i> 2016)	12
Figure 5. Modèle classique du mécanisme d'action moléculaire de LXR (Wang and Tontonoz 2018)	14
Figure 6. Mécanismes d'action des agonistes de LXR et des LXR dans le cancer (modifiée d'après Lin and Gustafsson 2015)	15
Figure 7. Modèle d'activation de l'agoniste de LXR dans les cellules cancéreuses (Ju <i>et al.</i> 2017).....	16
Figure 8. Rôles physiologiques du cholestérol dans le cancer (Murai 2015).....	18
Figure 9. Représentation schématique de la voie de biosynthèse du cholestérol (Cortes <i>et al.</i> 2014)	19
Figure 10. Voie de l'efflux de cholestérol via les transporteurs cellulaires ABCA1 et ABCG1 (Duffy and Rader 2009).....	21
Figure 11. LXR, un régulateur de transcription du métabolisme du cholestérol (Moschetta 2011)	22
Figure 12. Structure des principaux types de microdomaines membranaires (a- les radeaux planaires ; b- les cavéoles) (Martinez-Outschoorn, Sotgia, and Lisanti 2015).....	24
Figure 13. Voie de signalisation EGFR dépendante des radeaux lipidiques (Hryniewicz-Jankowska <i>et al.</i> 2014)	25
Figure 14. Régulation de l'apoptose à travers les radeaux membranaires (Gajate, Gonzalez-Camacho, and Mollinedo 2009).....	28
Figure 15. Schéma de la voie de signalisation PI3K/AKT médiée par les radeaux lipidiques (Reis-Sobreiro <i>et al.</i> 2013)	29
Figure 16. Schéma de fractionnement bioguidé de produits naturels (Sarker 2005)	32
Figure 17. Nombre approximatif de composés marins isolés au cours des 50 dernières années (Alves <i>et al.</i> 2018)	34
Figure 18. Thyrsiferyl 23-acetate	41
Figure 19. Laurenditerpenol	42
Figure 20. Laurinterol.....	42

Figure 21. Hexadecyl-1-O- α -L-arabinopyranoside	42
Figure 22. Thyrsiferol	43
Figure 23. Elatol	43
Figure 24. Parguerol 7,16-diacetate (1) et parguerol triacetate (2)	43
Figure 25. <i>Laurencia papillosa</i>	44
Figure 26. Structure générale du triacylglycérol.....	51
Figure 27. Structure de stérol	52
Figure 28. Structure des molécules de glycolipides présentes dans les algues marines.....	53
Figure 29. Structure générale des glycérophospholipides.....	54
Figure 30. Structure des molécules de phospholipides présentes dans les algues (Kumari <i>et al.</i> 2013) ...	55
Figure 31. Structure générale d'un sphingolipide.....	55
Figure 32. Carte montrant le site de collecte de <i>Laurencia papillosa</i> de la côte libanaise, voir le numéro 5 (Oksana Belous 2014)	62
Figure 33. Schéma de fractionnement de l'extrait brut de <i>Laurencia papillosa</i>	87
Figure 34. Profil en CCM des fractions F1 à F23 éluées avec du CH ₂ Cl ₂	88
Figure 35. Profil en CCM des fractions F24 à F58 éluées avec de l'acétone.....	89
Figure 36. Schéma de fractionnement de la fraction F6 de CH ₂ Cl ₂	91
Figure 37. Profil en CCM des sous-fractions de F6	92
Figure 38. Chromatogramme obtenu par CLHP de F6.9 à 210 nm	93
Figure 39. Chromatogramme obtenu par CLHP de F6.10 à 210 nm.....	93
Figure 40. Profil en CCM des sous-fractions de F6.9	94
Figure 41. Profil en CCM des sous-fractions de F6.10	94
Figure 42. Schéma de fractionnement de la fraction acétonique F24	96
Figure 43. Profil en CCM des sous-fractions de F24	96
Figure 44. Profil en CCM des sous-fractions de F24.7	97
Figure 45. Détection de l'apoptose par cytométrie en flux après double marquage avec l'annexine V-FITC/IP après 24 h de traitement avec F25.....	98
Figure 46. Niveaux relatifs d'expression d'ARNm de Bax, Bcl-2 et caspase-3 dans les cellules non traitées et traitées avec F25 pendant 24 h	98
Figure 47. Niveaux d'expression des protéines impliquées dans l'apoptose dans les cellules MCF-7 traitées ou non avec F25 pendant 24 h, tels que déterminés par Western blot.....	99
Figure 48. Schéma de fractionnement de la fraction acétonique F25	100

Figure 49. Chromatogramme obtenu par CLHP de F25 soluble à 254 nm	100
Figure 50. Détection de l'apoptose par cytométrie en flux après double marquage avec l'annexine V-FITC/IP après 24 h de traitement avec F47.....	101
Figure 51. Niveaux relatifs d'expression d'ARNm de Bax, Bcl-2 et caspase-3 dans les cellules non traitées et traitées avec F47 pendant 24 h	101
Figure 52. Niveaux d'expression des protéines impliquées dans l'apoptose dans les cellules MCF-7 traitées ou non avec F47 pendant 24 h, tels que déterminés par Western blot.....	101
Figure 53. Schéma de fractionnement de la fraction acétonique F47	102
Figure 54. Chromatogramme obtenu par CLHP de F47 à 230 nm	102
Figure 55. Schéma montrant les différents objectifs de la présente étude, modifié d'après (Krycer <i>et al.</i> 2010)	123

Liste des tableaux

Tableau 1. Quelques composés à activité cytotoxique isolés à partir de macroalgues marines	38
Tableau 2. Les métabolites secondaires isolés de <i>Laurencia papillosa</i> et leurs activités biologiques associées	46
Tableau 3. Gradient de solvants utilisé en CLHP semi-préparative	65
Tableau 4. Gradient de solvants utilisé en CLHP analytique.....	66

Introduction générale

La carcinogenèse est multifactorielle et implique des altérations dans un certain nombre de processus cellulaires tels que l'apoptose, la prolifération, la survie et la migration cellulaire. En raison de leur demande accrue en lipides membranaires et de leur besoin croissant en énergie, les cellules cancéreuses présentent un métabolisme lipidique altéré, notamment une lipogenèse et une biosynthèse du cholestérol augmentées. De nombreuses données suggèrent que cibler ce métabolisme dans les cellules tumorales pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse pour vaincre le cancer.

La plupart des médicaments anticancéreux actuellement utilisés sont cytotoxiques pour les cellules cancéreuses, mais également pour les cellules saines par manque de spécificité. Ce phénomène est donc responsable de nombreux effets indésirables. L'innovation en chimiothérapie anticancéreuse repose aujourd'hui sur la recherche de nouvelles molécules, à structure originale et/ou à mécanisme d'action innovant. Si la synthèse chimique de molécules a su faire ses preuves, ses capacités novatrices se sont amenuisées. *A contrario*, le milieu naturel constitue un vaste réservoir de molécules. Le milieu terrestre est ainsi exploité depuis des millénaires, mais ses limites ont été atteintes ces dernières années (redondance des structures chimiques et/ou des mécanismes d'action). Le milieu marin, pour des raisons techniques, a été plus récemment abordé. Une importante surface (70% de la planète) associée à une grande biodiversité phylogénique en font un réservoir qu'il est important d'explorer. De plus, l'exposition à des conditions environnementales particulières est à l'origine de la production d'une variété de métabolites bioactifs structurellement uniques et sans équivalent chez les organismes terrestres. Parmi les organismes marins, les macroalgues rouges du genre *Laurencia* constituent une cible de recherche attrayante en raison de leur grande diversité chimique dans le milieu marin. Ce genre est connu pour produire une variété de métabolites secondaires intéressants chimiquement et biologiquement.

Bien que leur teneur en lipides soit généralement faible, les macroalgues marines sont riches en acides gras polyinsaturés considérés comme des composants nutritionnels essentiels chez l'Homme et importants pour la santé humaine.

Les objectifs de cette thèse sont les suivants : 1) rechercher par bioguidage les composés responsables de l'activité cytotoxique de l'extrait de *Laurencia papillosa*, macroalgue répandue sur la côte libanaise, sur des cellules cancéreuses du sein, 2) étudier la composition en lipides, en acides gras et en stérols de

L. papillosa et 3) étudier l'effet du cholest-4-èn-3-one, un stéroïde identifié chez *L. papillosa*, sur la lipogénèse et la biosynthèse du cholestérol dans des cellules cancéreuses du sein.

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse est divisé en quatre chapitres principaux.

Dans un premier chapitre, nous rappellerons la dérégulation du métabolisme des lipides dans les cellules cancéreuses. Nous résumerons également le processus d'isolement bioguidé utilisé pour découvrir de nouveaux composés bioactifs. Une présentation des macroalgues marines, en particulier du genre *Laurencia*, en tant que source riche et variée de composés cytotoxiques, suivra. Enfin, nous présenterons les lipides des macroalgues marines.

Le deuxième chapitre exposera les résultats du fractionnement bioguidé de l'extrait de *L. papillosa* entrepris pour détecter des composés cytotoxiques sur une lignée cellulaire du cancer du sein. Le processus de fractionnement a été réalisé à deux échelles et en deux temps : sur un petit lot d'algues apporté en début de thèse et sur un lot plus conséquent récupéré l'année suivante.

Le troisième chapitre présentera la composition en acides gras des lipides totaux de cette macroalgue et de ses trois classes de lipides (lipides neutres, glycolipides et phospholipides), ainsi que la composition en stérols de la fraction insaponifiable des lipides neutres.

Le quatrième chapitre approfondira l'effet du cholest-4-èn-3-one identifié par fractionnement bioguidé sur la lipogénèse, la biosynthèse du cholestérol et l'intégrité des radeaux lipidiques dans les cellules cancéreuses du sein.

Chapitre I. Etude bibliographique

1. Métabolisme des lipides et cancer

Comprendre les différents mécanismes impliqués dans le développement et la progression du cancer est l'un des aspects essentiels de la recherche en oncologie. L'altération du métabolisme des lipides, notamment de la lipogenèse *de novo* et de la biosynthèse du cholestérol, est reconnue comme une caractéristique des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg 2011 ; Santos and Schulze 2012). Par conséquent, le ciblage du métabolisme des lipides dans les cellules cancéreuses pourrait constituer une stratégie thérapeutique efficace et spécifique dans le traitement du cancer.

1.1. Cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes (Torre *et al.* 2015). On estime que 2,1 millions de nouveaux cas de cancer et 627 000 décès dus au cancer du sein sont survenus en 2018 dans le monde entier ("WHO | Breast Cancer").

Le cancer du sein est une maladie hétérogène d'un point de vue clinique, histopathologique et génétique (Turashvili and Brogi 2017). Il n'y pas de causes uniques du cancer du sein, c'est une maladie d'origine multifactorielle. Plusieurs facteurs de risque de cancers sont connus, notamment les facteurs hormonaux et reproductifs (la puberté précoce avant 12 ans, la ménopause tardive après 55 ans, la première grossesse tardive après 30 ans), l'obésité, le mode de vie sédentaire et la mauvaise alimentation (Torre *et al.* 2015).

Dans ce contexte, l'altération du métabolisme lipidique a été étudiée en tant que facteur de risque et médiateur du cancer du sein (McDonnell *et al.* 2014 ; Stadler, Hacker, and Burkhardt 2016 ; Blücher and Stadler 2017). Dans cette partie de l'étude bibliographique, la synthèse *de novo* des acides gras (également appelée lipogenèse) et du cholestérol sera décrite en particulier dans le cancer du sein.

1.2. Biosynthèse des acides gras et cancer

Les acides gras sont des acides carboxyliques constitués d'une chaîne hydrocarbonée typiquement en nombre pair, saturée ou insaturée, et d'un groupe carboxyle terminal. Ils constituent les composants principaux des membranes biologiques, sont nécessaires au stockage de l'énergie et peuvent être des précurseurs de molécules de signalisation. Chez l'Homme adulte, la biosynthèse *de novo* des acides gras se produit habituellement dans le foie, le tissu adipeux et les glandes mammaires en période de lactation (Santos and Schulze 2012). Il est connu que la prolifération excessive des cellules cancéreuses nécessite une grande quantité de lipides pour la génération des membranes cellulaires et induit des

besoins énergétiques élevés (Baenke *et al.* 2013 ; Mounier, Bouraoui, and Rassart 2014). Pour répondre à ces besoins, les cellules cancéreuses présentent une lipogenèse *de novo* accrue (Menendez and Lupu 2007 ; Santos and Schulze 2012 ; Mounier, Bouraoui, and Rassart 2014).

1.2.1. Voie de la biosynthèse des acides gras

Le schéma général de la voie de la lipogenèse est illustré sur la Figure 1. Le glucose est une ressource importante pour la synthèse *de novo* des lipides. Dans les cellules, la voie métabolique de la glycolyse convertit le glucose en pyruvate. Dans la mitochondrie, le pyruvate est transformé en acétyl-CoA afin qu'il puisse entrer dans le cycle de l'acide citrique, également appelé cycle de Krebs. Le citrate est dérivé de ce cycle et exporté par une translocase de la mitochondrie vers le cytosol où il est converti par l'ATP Citrate Lyase (ACL ou ACLY) en oxaloacétate et en acétyl-CoA. Le processus de lipogenèse commence par la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA catalysée par l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC) (Santos and Schulze 2012 ; Baenke *et al.* 2013). Ensuite, l'enzyme multifonctionnelle homodimérique, Fatty Acid Synthase (FASN), vient synthétiser les acides gras saturés (AGS) à longue chaîne, en particulier l'acide palmitique (C16:0), par des réactions de condensation de l'acyl-CoA et du malonyl-CoA en présence de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) fournie par l'Enzyme Malique (ME). L'enzyme Elovl6 (ELongase of Very Long chain fatty acid 6) catalyse ensuite la conversion de l'acide palmitique en acide stéarique (C18:0). La désaturation des acides gras nouvellement synthétisés est catalysée par la Stéaroyl-CoA Désaturase 1 (SCD1) au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Man *et al.* 2006). L'enzyme SCD1 crée une double liaison dans la position $\Delta 9$ de l'acide palmitique et l'acide stéarique pour produire des acides gras monoinsaturés (AGMI), respectivement l'acide palmitoléique (C16:1 n-9) et l'acide oléique (C18:1 n-9). Les acides gras générés par la synthèse *de novo* peuvent ensuite être utilisés pour la synthèse de triglycérides (TG) pour le stockage d'énergie, ou de phospholipides (PL) pour la synthèse membranaire (Abramson 2011 ; Mounier, Bouraoui, and Rassart 2014).

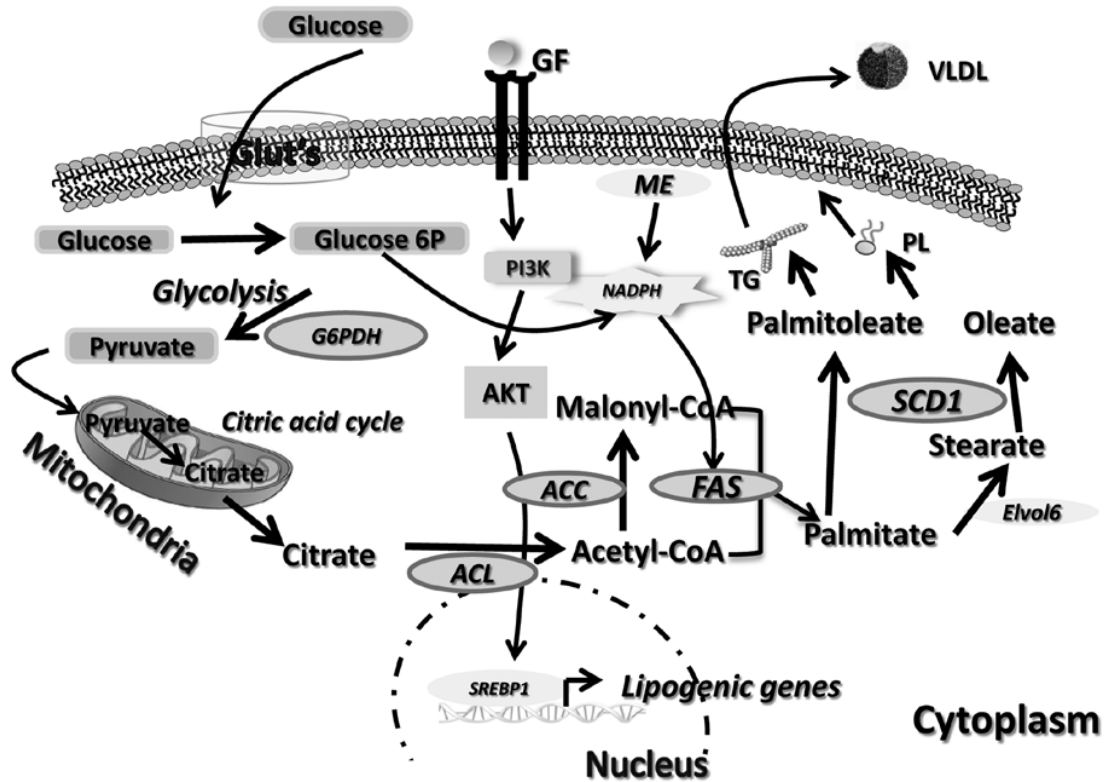


Figure 1. Représentation schématique des voies impliquées dans la lipogenèse (Mounier, Bouraoui, and Rassart 2014)

1.2.2. Biosynthèse aberrante des acides gras dans le cancer

Une lipogenèse *de novo* accrue est une caractéristique de divers cancers, notamment le cancer du sein, et se traduit par une augmentation importante de l'expression génique de plusieurs enzymes clés impliquées dans ce processus, notamment ACC1, FASN et SCD1.

L'ACC1 (également appelée ACC-alpha) est principalement exprimée dans les tissus lipogéniques et régule la synthèse des acides gras à longue chaîne. Il a été démontré que l'ACC1 est fortement exprimée dans diverses cellules cancéreuses, y compris les cellules cancéreuses du sein, et contribue à la croissance cellulaire en stimulant la lipogenèse (Sinilnikova *et al.* 2004 ; Monaco 2017). L'inhibition de l'activité de l'ACC1 par de petits ARN interférents (siRNA, small interfering RNA) réduit la synthèse de l'acide palmitique et conduit à l'apoptose des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 (Chajès *et al.* 2006).

La surexpression de FASN représente l'une des importantes altérations phénotypiques dans les cellules cancéreuses. De nombreuses études ont signalé une expression élevée de FASN dans divers cancers, notamment les cancers du sein, du côlon, de l'ovaire, du poumon et de la prostate (Van de Sande *et al.*

2002 ; Yoon *et al.* 2007 ; Phan, Yeung, and Lee 2014). En revanche, il a été démontré que les cellules cancéreuses du sein surexprimant FASN subissent l'apoptose lorsqu'elles sont traitées avec des inhibiteurs de FASN tels que le C75 et la céruléine ou avec des siRNA contre FASN (Yoon *et al.* 2007). L'oncogène HER2 (Human Epidermal Growth factor Receptor 2) est un membre de la famille des récepteurs tyrosine kinases et est surexprimé dans 30% des cancers du sein. En particulier, il a été démontré que la surexpression de HER2 augmente l'expression de FASN et ACC1 dans les cellules du cancer du sein HER2/positif (Yoon *et al.* 2007 ; Baumann, Sevinsky, and Conklin 2013 ; Monaco 2017). En revanche, l'inhibition de l'activité de HER2 avec des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs de la tyrosine kinase réduisait l'expression de FASN, entraînant ainsi une suppression de l'invasion des cellules cancéreuses du sein (Monaco 2017). Jin *et al.* ont rapporté que FASN est directement phosphorylée par HER2 et donc activée, induisant ainsi une lipogénèse accrue dans les cellules cancéreuses du sein, et que toute inhibition de cette phosphorylation réduirait l'invasion cellulaire (Jin *et al.* 2010). L'expression accrue de FASN est donc associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein.

L'enzyme SCD1, également appelée delta-9-désaturase, est fortement exprimée dans le foie et le tissu adipeux et catalyse la production d'AGMI essentiels à la biogénèse membranaire. Une teneur accrue en AGMI a été remarquée dans les cellules cancéreuses, indiquant le rôle de SCD1 dans le développement du cancer (Mounier, Bouraoui, and Rassart 2014). Une expression élevée de SCD1 a été observée dans différentes cellules cancéreuses notamment du sein, du poumon, du côlon et du rein (Monaco 2017 ; Zhao *et al.* 2017) et s'est avérée associée à une prolifération des cellules cancéreuses et à une diminution de la mort cellulaire (Angelucci *et al.* 2018). Les œstrogènes sont nécessaires à la croissance des cellules cancéreuses du sein à récepteurs d'œstrogènes positifs (ER+). Belkaid *et al.* ont constaté que le 17-beta-estradiol augmente l'expression de SCD1 et le contenu en AGMI dans les cellules de cancer du sein ER+, MCF-7 et T-47D (Belkaid *et al.* 2015). Une récente étude de Zhao *et al.* montre que MF-438, un inhibiteur de SCD1, inhibe la prolifération des cellules du cancer du sein MCF-7, induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire et diminue la capacité de migration (Zhao *et al.* 2017).

Prises ensemble, ces données suggèrent une corrélation positive entre l'expression des enzymes de la lipogénèse et le développement et la progression du cancer, notamment du cancer du sein.

1.2.3. Molécules ciblant les enzymes de la lipogénèse dans le cancer

Les enzymes impliquées dans la lipogénèse constituent une cible idéale dans le développement de stratégies thérapeutiques pour le cancer. La figure ci-après résume les mécanismes de plusieurs molécules ciblant la voie de la lipogénèse pour le traitement du cancer (Figure 2).

Le SB-204990, inhibiteur de l'ACLY, a été montré pour inhiber la prolifération des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain et la croissance tumorale chez des souris atteintes de xénogreffes (Hatzivassiliou *et al.* 2005).

Le TOFA (acide 5-tétradécyl-oxy-2-furoïque) est un inhibiteur allostérique de l'ACC (Abramson 2011). Il est cytotoxique pour les cellules cancéreuses du poumon humain NCI-H460 et les cellules de carcinome du côlon HCT-8 et HCT-15 et induit l'apoptose de ces cellules en inhibant la synthèse des acides gras (Wang *et al.* 2009).

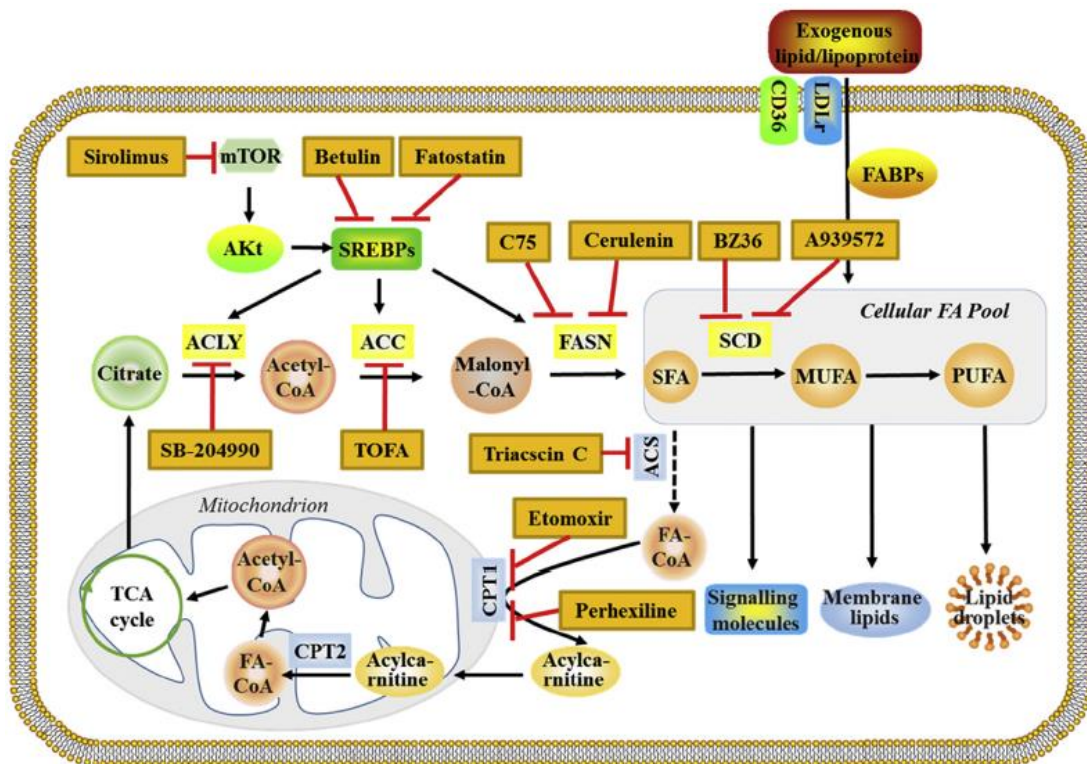


Figure 2. Principaux mécanismes d'action des produits pharmaceutiques inhibant le métabolisme des lipides dans les cellules cancéreuses (Liu *et al.* 2017)

L'inhibition de FASN est une cible thérapeutique prometteuse dans le cancer et de nombreux inhibiteurs ont été étudiés, tels que la céruléine, le C75, la tétrahydrolipstatine (Orlistat), le triclosan et le gallate d'épigallocatechine (EGCG) (Jones and Infante 2015). La céruléine, un époxydodécadiénamide, est un

antibiotique antifongique qui induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein et du côlon par inhibition non compétitive de FASN (Cheng, Wang, and Chen 2014). En outre, il a été montré qu'elle inhibe la synthèse des acides gras, retarde la progression tumorale et augmente la survie dans un modèle de xénogreffe du cancer de l'ovaire (Pizer *et al.* 1996). Son utilisation est limitée en raison de sa structure instable et de sa toxicité (Cheng, Wang, and Chen 2014). Le C75 est un analogue synthétique de la cérulénine. Le traitement avec C75 des xénogreffes sous-cutanées de cellules cancéreuses du sein MCF-7 chez des souris nudes athymiques inhibe la synthèse des acides gras et la croissance tumorale et induit l'apoptose (Pizer *et al.* 2000). Son utilisation clinique est limitée en raison de son caractère instable. L'Orlistat est un médicament anti-obésité approuvé par les autorités sanitaires américaine (Food and Drug Administration, FDA) et européenne (European Medicines Agency, EMA) (Cheng, Wang, and Chen 2014). Il a été rapporté que l'Orlistat diminue la prolifération des cellules cancéreuses du sein en bloquant la progression du cycle cellulaire en phase G1/S via la voie protéique du rétinoblastome (Kridel *et al.* 2004). Il est limité par sa faible solubilité en milieu aqueux et sa faible biodisponibilité orale (Abramson 2011). Le triclosan est un agent antibactérien et antifongique de synthèse utilisé dans des produits de soins dermatologiques (Abramson 2011). Il présente une activité inhibitrice de FASN associée à une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires du cancer du sein MCF-7 et SK-BR-3 (Liu *et al.* 2002). L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) est extraite du thé vert *Camellia sinensis* (Cheng, Wang, and Chen 2014). L'EGCG inhibe l'activité de FASN, induit l'apoptose et provoque une diminution des protéines HER2, PI3K/AKT (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protéine kinase B) et ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2) dans les cellules cancéreuses du sein (Puig *et al.* 2008). Son utilisation thérapeutique est limitée en raison de son caractère instable et de son hépatotoxicité. Néanmoins, une préparation contenant un extrait sec et raffiné de feuilles de thé vert *Camellia sinensis* est actuellement commercialisée dans la spécialité topique Veregen® pour la prise en charge des verrues génitales et périanales externes dûes aux papillomavirus.

L'inhibition de SCD1 est une autre stratégie visant à réduire l'apport en acides gras dans les cellules cancéreuses. Il a été signalé que l'A939572 réduit la prolifération des cellules cancéreuses du rein et induit l'apoptose en inhibant l'activité enzymatique de SCD1 (von Roemeling *et al.* 2013).

1.2.4. Régulateurs de la biosynthèse des acides gras

1.2.4.1. SREBP

La plupart des enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras sont principalement régulées par les facteurs de transcription SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) (Horton 2002 ; Santos and Schulze 2012 ; Mounier, Bouraoui, and Rassart 2014). Il existe trois isoformes de SREBP dans les cellules de mammifères avec des rôles différents, SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. SREBP-1a contrôle la synthèse des acides gras et du cholestérol, alors que SREBP-1c régule principalement la synthèse des acides gras. Quant à SREBP-2, il régule la synthèse du cholestérol. La plupart des études ne font pas la distinction entre SREBP-1a et SREBP-1c et se limitent à SREBP-1.

a. Régulation moléculaire de l'activité de SREBP

Les SREBP sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs liés à la membrane du réticulum endoplasmique où ils sont associés à la protéine transmembranaire polytopique SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein) qui se lie à la protéine INSIG (Insulin-induced gene) (Yoon *et al.* 2007 ; Baenke *et al.* 2013). À de faibles niveaux de stérols intracellulaires, pour devenir transcriptionnellement actif, le complexe SCAP/SREBP se dissocie d'INSIG puis migre vers l'appareil de Golgi (Figure 3). SREBP est ensuite clivé par deux protéases dans le Golgi, entraînant la libération du domaine NH₂-terminal de SREBP qui pénètre dans le noyau où il active la transcription des gènes cibles (Sakai *et al.* 1998). Ce processus est négativement régulé par les stérols qui se lient à SCAP ou INSIG et favorisent leur association, ce qui empêche la translocation de SCAP/SREBP vers Golgi et entraîne une réduction de l'activation de SREBP (Figure 3).

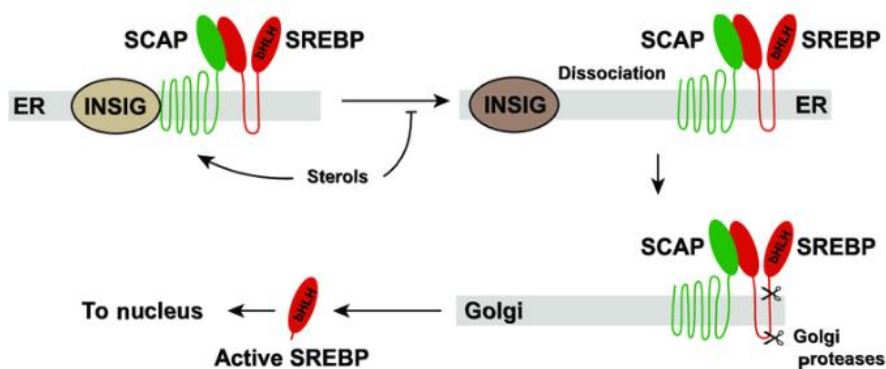


Figure 3. Activation protéolytique de SREBP (Moon 2017)

b. Activation de SREBP dans le cancer

L'activation anormale de SREBP est impliquée dans le développement du cancer. En effet, sa surexpression a été observée dans certains types de cancer, notamment les cancers de l'ovaire, du pancréas, de la prostate et en particulier du sein (Phan, Yeung, and Lee 2014). Le knockdown de SREBP-1 inhibe la migration et l'invasion des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 alors que sa forte expression est liée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes du cancer du sein (Bao *et al.* 2016).

Il convient de noter que SREBP-1 est aussi une cible en aval de différentes voies de signalisation des récepteurs du facteur de croissance ou des hormones stéroïdes activées dans le cancer, y compris les voies PI3K/AKT, mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Menendez and Lupu 2007 ; Baumann, Sevinsky, and Conklin 2013 ; Mounier, Bouraoui, and Rassart 2014). En général, l'altération de ces voies de signalisation cellulaire dans le cancer contribue à la prolifération et à la survie cellulaire. Il a été démontré que l'activation de mTORC1 en aval des voies de signalisation PI3K et KRAS active SREBP et ses gènes cibles dans plusieurs lignées cellulaires du cancer du sein et induit donc une lipogénèse, ainsi que la croissance et la survie cellulaire (Ricoult *et al.* 2016).

Il existe plusieurs mécanismes de régulation de SREBP via la voie PI3K/AKT/mTORC1 dans les cellules cancéreuses : AKT peut induire l'accumulation nucléaire de SREBP (Porstmann *et al.* 2005) ou augmenter la stabilité de SREBP via l'inhibition de GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) (Figure 4) (Bengoechea-Alonso and Ericsson 2009). AKT peut également activer SREBP en activant mTORC1. Dans ce cas, il existe deux mécanismes de régulation de SREBP : la phosphorylation et donc l'activation de S6K1 (ribosomal S6 Kinase 1) par mTORC1 et la phosphorylation de Lipin-1, une phosphatase acide phosphatidique, par mTORC1 empêchant ainsi la translocation nucléaire de Lipin-1 et favorisant l'activité de SREBP (Peterson *et al.* 2011). En conséquence, l'expression élevée de SREBP augmente l'expression de gènes cibles, en particulier ceux impliqués dans la biosynthèse des acides gras (FASN) et du cholestérol (HMGCR).

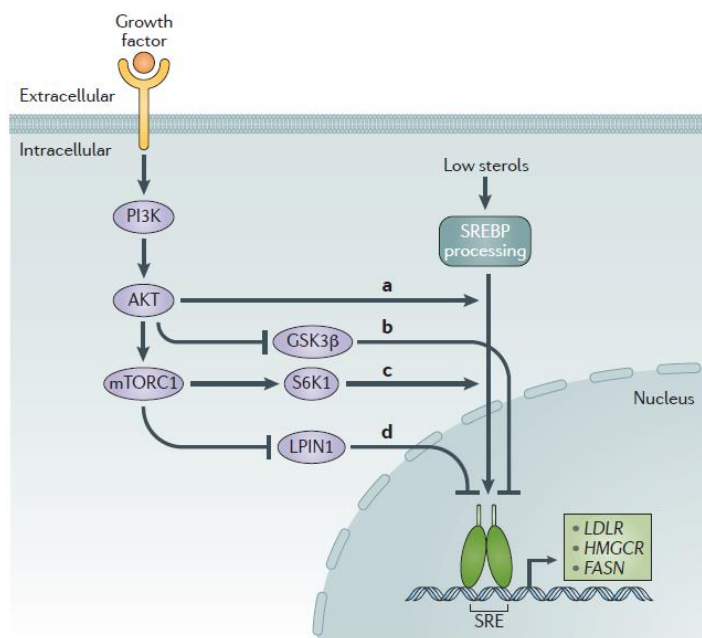


Figure 4. Régulation de l'activité de SREBP par la voie PI3K/AKT/mTORC1 dans le cancer (Mullen et al. 2016)

L'étude de Yang *et al.* montre que le traitement des cellules cancéreuses du sein MCF-7 avec EGF (Epidermal Growth Factor) augmente l'expression de SREBP-1 et FASN, alors que l'exposition de ces cellules aux inhibiteurs de la MAPK (PD98059) et de la PI3K (wortmannine) réduit l'expression de SREBP-1 ainsi que celle de FASN (Yang *et al.* 2003). Ces données prouvent donc bien que SREBP-1 est régulé par les voies MAPK et PI3K et que la transcription de FASN est régulée par SREBP-1 (Yang *et al.* 2003). Cependant, le rôle de SREBP-1 dans la régulation des gènes de la lipogenèse n'est toujours pas clair dans le cancer du sein. Yoon *et al.* ont constaté que l'expression de FASN et ACC1 n'était pas régulée par SREBP-1 dans les cellules cancéreuses du sein BT474, mais par HER2 via la voie de signalisation mTOR (Yoon *et al.* 2007).

c. Molécules ciblant SREBP dans le cancer

Le ciblage de SREBP pourrait également être une stratégie prometteuse pour cibler les voies métaboliques lipidiques altérées. En effet, de petites molécules ont été identifiées pour inhiber la translocation de SREBP du réticulum endoplasmique vers le Golgi afin de maintenir SREBP dans son état inactif, y compris la fatostatine et la bétuline. Il a été démontré que la fatostatine se lie au SCAP et inhibe par la suite la capacité de ce dernier à transporter SREBP vers Golgi. Par conséquent, la fatostatine supprime la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate, réduit l'invasion et la migration, induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et une apoptose et réduit également la

croissance des xénogreffes du cancer de la prostate (Li *et al.* 2014). De même, il a été constaté que la bétuline se lie au SCAP et favorise l'interaction entre SCAP et INSIG, ce qui inhibe la capacité de SCAP à transporter SREBP vers l'appareil de Golgi. Par conséquent, en inhibant l'activation de SREBP, la bétuline réduit la synthèse des acides gras et du cholestérol, améliore l'obésité induite par un régime alimentaire chez les souris, diminue les taux de lipides et augmente la sensibilité à l'insuline (Tang *et al.* 2011).

Des inhibiteurs indirects de SREBP ont également été développés. Comme mentionné ci-dessus, mTORC1 régule SREBP en contrôlant l'entrée nucléaire de Lipin-1 qui agit en tant que régulateur négatif de la translocation nucléaire de SREBP (Peterson *et al.* 2011). Torin1 est un inhibiteur puissant et sélectif de la mTOR kinase. Son effet sur la translocation nucléaire de Lipin-1 a été documenté et il a été constaté qu'il inhibe la phosphorylation de Lipin-1 et provoque ainsi la translocation nucléaire de Lipin-1, entraînant une régulation négative de SREBP.

1.2.4.2. LXR

Les LXR (Liver X Receptor) sont connus comme régulateurs de l'expression de SREBP-1c et de la lipogenèse *de novo*. Ces récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription régulés par la liaison de ligands naturels tels que les oxystérols et le 22(R)-hydroxycholestérol ou de ligands synthétiques tels que GW3965 et T0901317. Il existe deux isoformes qui partagent des séquences homologues mais ont des distributions tissulaires différentes : LXR α exprimé dans les organes présentant un fort métabolisme lipidique tels que le foie, le tissu adipeux, l'intestin et les reins et LXR β exprimé de manière ubiquitaire.

a. Mécanisme d'action de LXR

Les LXR forment des hétérodimères avec les récepteurs RXR (Retinoid X Receptor) et se lient aux LXRE (éléments de réponse à LXR) dans la région du promoteur des gènes cibles (Figure 5) (Hong and Tontonoz 2014 ; Griffett and Burris 2016 ; Komati *et al.* 2017). En l'absence de ligands, LXR/RXR se lient aux corépresseurs et répriment l'expression des gènes cibles. Alors qu'en présence de ligands de LXR tels que les oxystérols ou les ligands synthétiques, ou de ligands de RXR tels que l'acide 9-cis-rétinoïque, les corépresseurs sont libérés et remplacés par des coactivateurs, activant ainsi l'expression des gènes cibles. L'activation de LXR régule l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse tels que ACC1, FASN et SREBP-1c (Grefhorst *et al.* 2002 ; Darimont *et al.* 2006 ; Flaveny *et al.* 2015).

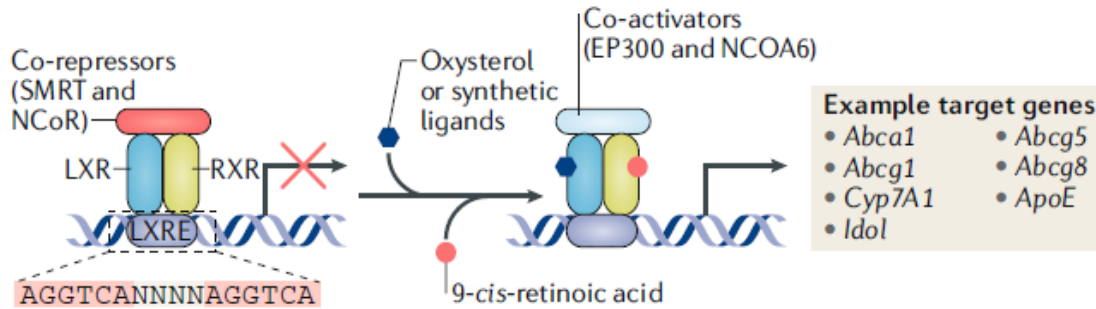


Figure 5. Modèle classique du mécanisme d'action moléculaire de LXR (Wang and Tontonoz 2018)

b. LXR dans la synthèse des acides gras

Dans le foie, les LXR régulent la synthèse des acides gras. Il a été documenté que l'administration orale de l'agoniste synthétique de LXR, T0901317, à des souris et à des hamsters induit l'expression de SREBP-1c et de ses gènes cibles (ACC, SCD1 et FASN), entraînant une augmentation du taux de triglycérides dans le plasma et le foie (Schultz *et al.* 2000). En revanche, l'administration de T0901317 à des souris dépourvues de gènes LXR α et LXR β a entraîné une absence de régulation des gènes de la lipogenèse, ce qui confirme la nécessité de LXR pour l'activation de la lipogenèse. Joseph *et al.* ont rapporté que les souris dépourvues de LXR α présentent une faible expression des gènes impliqués dans la lipogenèse, notamment SREBP-1, ACC, FASN et SCD1 (Joseph, Laffitte, *et al.* 2002). En effet, il a été souligné que l'expression accrue de SREBP-1c peut être responsable de la lipogenèse hépatique médiée par LXR. Il est intéressant de noter que l'expression de LXR α est plus importante que celle de LXR β dans le foie et que l'activité lipogénique des agonistes de LXR est plutôt médiée par LXR α (Schultz *et al.* 2000 ; Joseph, Laffitte, *et al.* 2002).

c. Molécules ciblant LXR dans le cancer

Des études récentes ont montré que les agonistes de LXR inhibent la prolifération de différentes lignées de cellules cancéreuses, notamment celles du sein, de la prostate, des ovaires, du côlon et de la leucémie (El Roz *et al.* 2013 ; Komati *et al.* 2017). Il a été suggéré que l'effet antiprolifératif observé après l'activation de LXR peut être lié à plusieurs mécanismes tels que l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et le métabolisme des lipides (Figure 6).

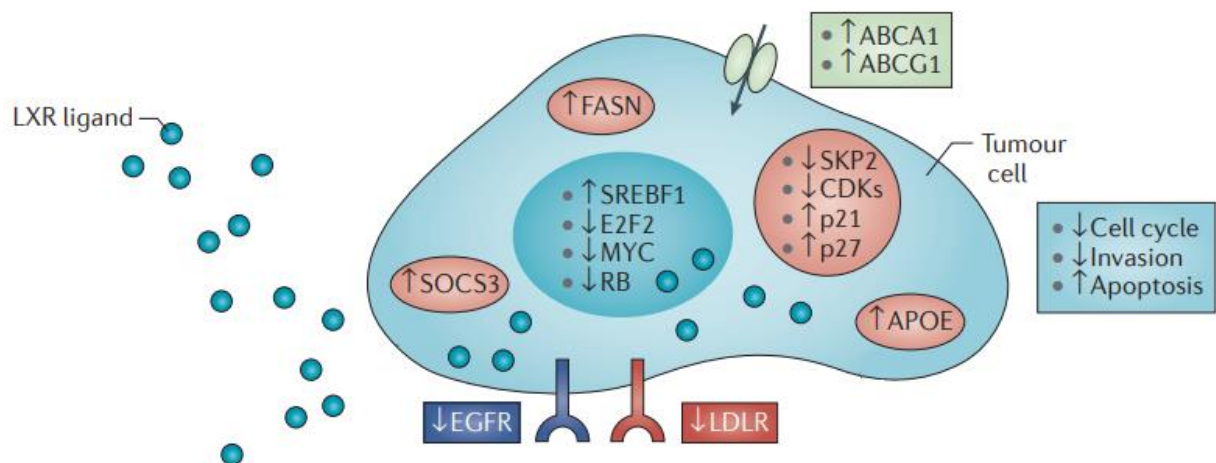


Figure 6. Mécanismes d'action des agonistes de LXR et des LXR dans le cancer (modifiée d'après Lin and Gustafsson 2015)

Nguyen-Vu *et al.* ont effectué une analyse par microréseau de l'expression des gènes associés aux effets antiprolifératifs des ligands de LXR dans les cellules de cancer du sein (MCF-7, T-47D, SK-BR-3 et MDA-MB-231) (Nguyen-Vu *et al.* 2013). Ils ont trouvé que l'agoniste de LXR, GW3965, diminue l'expression de E2F2, un membre de la famille des facteurs de transcription E2F impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

Vedin *et al.* ont montré que les agonistes synthétiques de LXR (T0901317 et GW3965) inhibent la prolifération des cellules cancéreuses du sein (MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 et SK-BR-3) (Vedin *et al.* 2009). Le traitement des cellules MCF-7 avec ces agonistes a supprimé l'expression de Skp2, de la cycline A2 et de la cycline D1, augmenté l'expression de p53 et diminué la phosphorylation du rétinoblastome (Rb), menant à l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, il a augmenté l'expression des gènes de la lipogenèse (SREBP-1c, FASN et SCD1), mais l'effet antiprolifératif de LXR était indépendant de la lipogenèse puisque le knockdown de SREBP-1c n'a pas bloqué l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par les agonistes de LXR.

Kim *et al.* ont démontré que l'activation de LXR par T0901317 ou GW3965 supprime la prolifération de plusieurs cellules et induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Kim *et al.* 2010). L'effet antiprolifératif de l'activation de LXR était associé à une expression accrue des gènes de la lipogenèse, SREBP-1 et FASN, et à une accumulation de triglycérides.

Une autre étude a montré que les agonistes de LXR, T0901317 et 22(R)-hydroxycholestérol, inhibent la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF-7, et que T0901317 réduit le pourcentage de cellules en phase S et augmente le pourcentage de cellules en G1, provoquant ainsi un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Chuu and Lin 2010).

Rough *et al.* ont montré que le traitement par T0901317 entraîne une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses de l'ovaire humain CaOV3, SKOV3 et A2780, et un arrêt de la progression du cycle cellulaire comme indiqué par l'augmentation du nombre de cellules dans la phase G0/G, la diminution du nombre de cellules dans G2/M, l'augmentation de l'expression des protéines p21 et p27 et l'inhibition de la phosphorylation de Rb (Rough *et al.* 2010).

Une autre étude a révélé que les cellules cancéreuses du pancréas traitées avec GW3965 bloquent la prolifération cellulaire et diminuent l'expression des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire Skp2 et la signalisation du facteur de croissance EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Candelaria *et al.* 2014).

Compte-tenu de l'effet antiprolifératif de l'activation de LXR dans les cellules cancéreuses, un certain nombre de ligands de LXR ont été identifiés et développés comme cibles potentielles dans le traitement du cancer. GW3965 et T0901317 sont les deux agonistes de LXR les plus étudiés et utilisés en recherche (Schultz *et al.* 2000 ; Collins *et al.* 2002), ils induisent l'expression de gènes cibles de LXR α et LXR β . Il a été démontré que les agonistes de LXR inhibent la prolifération cellulaire et induisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules cancéreuses par plusieurs mécanismes, telles que l'inhibition des voies de signalisation Wnt et PI3K/AKT, l'augmentation de l'expression d'enzymes impliquées dans la lipogenèse (FASN), la sécrétion de l'apolipoprotéine E (APOE), l'augmentation de l'expression de p27, etc. (Figure 7) (Ju *et al.* 2017).

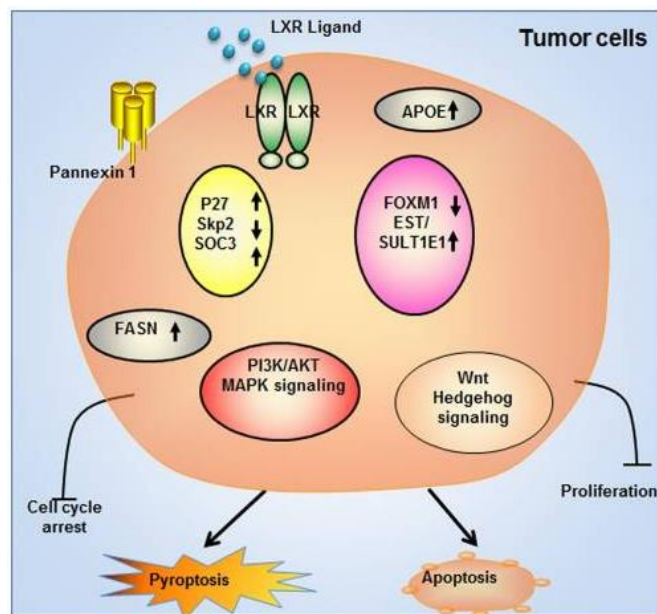


Figure 7. Modèle d'activation de l'agoniste de LXR dans les cellules cancéreuses (Ju *et al.* 2017)

Cependant, aucun de ces agonistes n'est utilisé à des fins thérapeutiques en raison de leurs actions non sélectives sur LXR α et β . En fait, l'activation de LXR α peut provoquer des effets indésirables, tels qu'une lipogenèse hépatique accrue, une hypertriglycéridémie et une stéatose hépatique (Joseph, McKilligin, *et al.* 2002 ; Chen *et al.* 2018). Ces données suggèrent que les agonistes de LXR β pourraient avoir moins d'effets indésirables que les agonistes de LXR α , ce qui pourrait aider à améliorer le potentiel thérapeutique des agonistes de LXR. Par conséquent, des agonistes partiels présentant une grande sélectivité pour LXR β par rapport à LXR α ont été développés, par exemple LXR-623. Il a été le premier agoniste de LXR à participer à des essais cliniques et il a été démontré qu'il réduit le cholestérol total et le cholestérol LDL (Low-Density Lipoprotein) sans activer la lipogenèse hépatique (faible expression de FASN, INSIG et SREBP-1) (Quinet *et al.* 2009). Mais son développement a ensuite été interrompu à la suite des effets indésirables psychiatriques et neurologiques observés chez les participants traités par LXR-623.

1.3. Biosynthèse du cholestérol et cancer

Outre la dérégulation de la biosynthèse des acides gras dans les cellules cancéreuses, il a été démontré qu'une biosynthèse accrue du cholestérol, une autre voie importante du métabolisme des lipides, joue un rôle dans le développement du cancer. Le cholestérol est un composant essentiel des membranes cellulaires et sert également de précurseur des hormones stéroïdes et des oxystérols chez les mammifères (Baenke *et al.* 2013 ; Murai 2015). L'homéostasie du cholestérol est régulée par de nombreux mécanismes tels que la biosynthèse via HMGCR (3-Hydroxy-3-Méthyl-Glutaryl-CoA Réductase), l'efflux via des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette transporter) et l'absorption via LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor).

1.3.1. Rôle du cholestérol dans le cancer

De nombreuses études suggèrent que le cholestérol joue un rôle important dans le développement et la progression du cancer (Figure 8). Les cellules cancéreuses hautement prolifératives ont besoin d'un excès de cholestérol pour générer des membranes. Ainsi, pour augmenter leur teneur en cholestérol, elles augmentent la biosynthèse *de novo* du cholestérol (Baenke *et al.* 2013). Les hormones stéroïdiennes synthétisées à partir du cholestérol interviennent dans le développement et la progression de divers cancers, notamment les cancers du sein et de la prostate. Des concentrations élevées d'œstrogènes ont été associées à un risque accru de cancer du sein (Murai 2015). En plus, il a été montré que les androgènes stimulent la lipogenèse dans les cellules cancéreuses de la prostate en

augmentant l'expression de FASN et HMGCR (Hager, Solomon, and Freeman 2006). Il a également été démontré que l'oxystérol 27-hydroxycholestérol (27HC), un métabolite primaire du cholestérol et un agoniste de LXR, favorise la croissance tumorale et les métastases dans des modèles murins de cancer du sein (Nelson *et al.* 2013 ; Blücher and Stadler 2017). De plus, le cholestérol est un composant important des radeaux lipidiques qui organisent les molécules de signalisation impliquées dans les voies associées à la progression du cancer (Murai 2015). Une partie "radeaux lipidiques et cancer" sera développée plus tard.

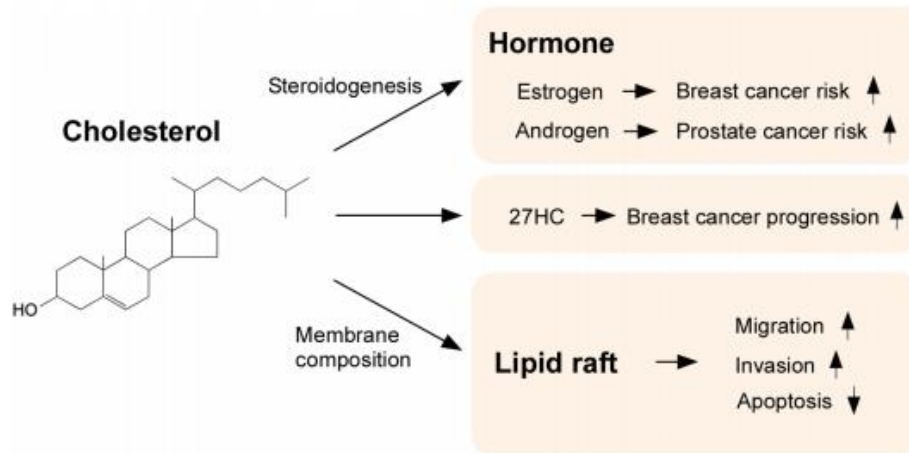


Figure 8. Rôles physiologiques du cholestérol dans le cancer (Murai 2015)

Les cellules cancéreuses ont donc besoin de cholestérol pour leur croissance et leur survie. Par conséquent, la réduction du taux de cholestérol intracellulaire peut constituer une stratégie de prévention et/ou de traitement du cancer.

1.3.2. Voie de la biosynthèse du cholestérol

La voie de biosynthèse du cholestérol est présentée dans la figure ci-après (Figure 9). La biosynthèse du cholestérol débute à partir de l'acétyl-CoA qui sera condensé avec l'acétoacétyl-CoA pour former le 3-Hydroxy-3-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA). Ce dernier est ensuite réduit en mévalonate par HMGCR qui est une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique. La décarboxylation du mévalonate et sa phosphorylation conduisent à l'unité isoprényle caractéristique des terpènes, l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et à sa forme activée, le diméthyl-allyl pyrophosphate (DMAPP). La condensation de ces deux unités aboutit au géranyl-pyrophosphate (GPP). La condensation d'un GPP et d'un IPP fournit alors le farnésyl pyrophosphate (FPP). Le couplage queue à queue de deux FPP permet

enfin l'obtention du squalène. Par la suite, une réaction de cyclisation transforme le squalène en lanostérol, qui est dévié en deux voies pour produire du cholestérol à partir de desmostérol ou de 7-déhydrocholestérol.

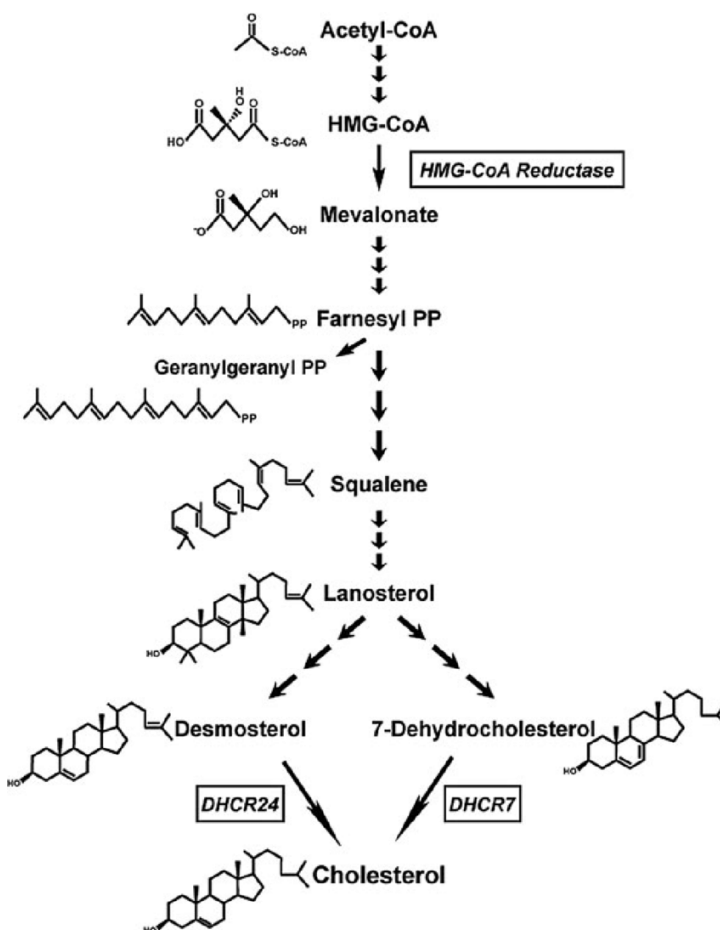


Figure 9. Représentation schématique de la voie de biosynthèse du cholestérol (Cortes *et al.* 2014)

1.3.3. Biosynthèse aberrante du cholestérol dans le cancer

Une surexpression de l'enzyme limitante de la synthèse du cholestérol, HMGCR, a été observée dans de nombreux cancers, y compris le cancer du sein (Clendening *et al.* 2010 ; McDonnell *et al.* 2014). Les statines sont des inhibiteurs de l'HMGCR aux propriétés hypocholestérolémiantes. Il a été démontré que les patientes traitées avec des statines ont un risque plus faible de développer un cancer du sein, ce qui suggère le rôle de HMGCR dans le cancer (Clendening *et al.* 2010). L'étude de Sánchez *et al.* a souligné l'effet antiprolifératif de l'atorvastatine, de la fluvastatine et de la simvastatine sur les cellules cancéreuses du sein MCF-7 (Sánchez *et al.* 2008). Cet effet était associé à une diminution de la synthèse de l'ADN et à un arrêt du cycle cellulaire dans les phases G1 et G2/M.

1.3.4. Molécules ciblant l'enzyme de biosynthèse du cholestérol dans le cancer

La méthode la plus efficace pour bloquer la biosynthèse du cholestérol consiste à inhiber HMGCR avec des statines. Les statines sont commercialisées comme agents réduisant le cholestérol et font actuellement l'objet d'essais cliniques de phases I, II et III pour le traitement de divers types de cancer (Mullen *et al.* 2016). De nombreuses études ont montré que les statines peuvent inhiber la croissance des cellules cancéreuses, induire l'apoptose et réduire l'invasion et les métastases.

1.3.5. Régulateurs de la biosynthèse du cholestérol

1.3.5.1. SREBP

L'expression des gènes de la voie de la biosynthèse du cholestérol est principalement contrôlée par les facteurs de transcription SREBP. Le SREBP-2 régule spécifiquement HMGCR, l'enzyme clé responsable de la biosynthèse du cholestérol, tandis que le SREBP-1a régule l'expression des gènes de synthèse du cholestérol et des acides gras. Comme déjà mentionné, le SREBP-2 et le SREBP-1a sont surexprimés dans les cancers.

a. Molécules ciblant SREBP dans le cancer

L'inhibition de l'HMGCR par les statines entraîne une réduction de la synthèse du cholestérol, ce qui déclenche l'activation de SREBP-2 et la transcription des gènes de cette voie. Par conséquent, le ciblage de SREBP-2 pour potentialiser les effets anticancéreux des statines constitue une stratégie très prometteuse. Le dipyridamole est un médicament approuvé aux Etats-Unis et en Europe pour la prévention de l'ischémie cérébrale. Il a été démontré que le dipyridamole inhibe le clivage de SREBP-2, empêchant ainsi l'augmentation de l'expression des gènes cibles, HMGCR et HMGCS1 (Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A Synthase 1), induite par les statines. La combinaison statine-dipyridamole induit une apoptose dans les cellules de leucémie aiguë myéloïde (LAM) et de myélome multiple et dans des échantillons de patients atteints de LAM primaire, et une diminution de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe de leucémie (Pandya *et al.* 2014).

1.3.5.2. LXR

Les LXR jouent un rôle principal dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. L'activation de LXR régule la transcription des gènes impliqués dans l'efflux de cholestérol, la première étape du transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie médiée par les lipoprotéines de haute densité (HDL, High Density Lipoprotein) (Wang *et al.* 2008 ; Kim *et al.* 2010 ; Flaveny *et al.* 2015).

Parmi ces gènes, on peut citer les transporteurs ABCA1 (ATP-Binding Cassette sub-family A member 1) et ABCG1 (ATP-Binding Cassette sub-family G member 1).

a. Efflux de cholestérol : LXR/ABC

Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires chargées de transporter divers substrats physiologiques (vitamines, acides aminés, stérols, ...) à travers la membrane cellulaire (Xiong *et al.* 2018). Le génome humain contient 51 gènes ABC répartis en sept sous-familles A-G, et certaines maladies se sont révélées être associées à leur dysfonctionnement. Certains des transporteurs ABC sont sous le contrôle de LXR associé à l'hétérodimère RXR, et d'autres sont régulés par le facteur de transcription PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) (Duffy and Rader 2009). En particulier, ABCA1 et ABCG1 assurent l'efflux de cholestérol cellulaire des macrophages vers l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I) à travers la membrane plasmique pour la formation des HDL (Gelissen *et al.* 2006 ; Xiong *et al.* 2018). Plus précisément, ABCA1 est impliqué dans l'efflux de cholestérol cellulaire vers ApoA-I des HDL pauvres en lipides, alors que ABCG1 assure l'efflux du cholestérol des macrophages vers les HDL matures riches en cholestérol (Figure 10) (Argmann *et al.* 2005).

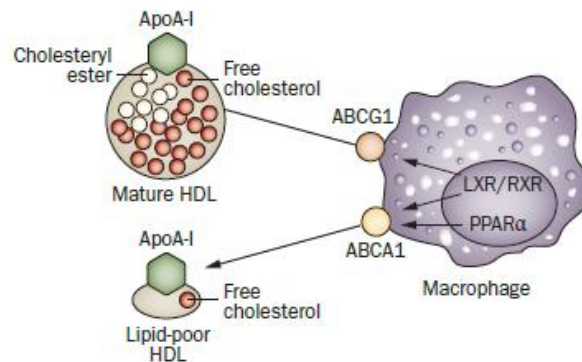


Figure 10. Voie de l'efflux de cholestérol via les transporteurs cellulaires ABCA1 et ABCG1 (Duffy and Rader 2009)

Une augmentation du taux de cholestérol intracellulaire est constatée dans les cellules cancéreuses (Smith and Land 2012). En fait, la réduction de l'expression de ABCA1 a été observée dans les cancers du sein, du côlon et du foie (Smith and Land 2012). Il a été démontré que l'expression réduite de ABCA1 est associée à un phénotype agressif chez les patientes atteintes d'un cancer du sein et à un mauvais pronostic (Schimanski *et al.* 2010). L'étude d'El Roz *et al.* montre que le traitement des cellules cancéreuses du sein MCF-7 avec des agonistes de LXR (T0901317 et 22(R)-hydroxycholestérol)

augmente l'efflux de cholestérol vers les HDL via une expression augmentée du transporteur ABCG1 et réduit la teneur en cholestérol cellulaire, entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose (El Roz *et al.* 2012). En revanche, Lee *et al.* montrent que l'hyperméthylation du promoteur ABCA1 entraîne une augmentation du taux de cholestérol dans les cellules du cancer de la prostate LNCaP, favorisant ainsi la progression du cancer (Lee *et al.* 2013). De plus, il a été démontré que l'activation du transporteur ABCA1 inhibe l'accumulation de cholestérol mitochondrial, ce qui entraîne une augmentation de la libération de cytochrome c (caractéristique de l'apoptose) et une inhibition de la voie de signalisation de AKT dépendante de la survie des cellules cancéreuses (Smith and Land 2012). Ces différentes données démontrent l'effet antitumoral de la fonction d'efflux des transporteurs ABCA1 et ABCG1.

b. LXR dans la biosynthèse du cholestérol

La figure ci-dessous résume les voies de signalisation de LXR dans le métabolisme du cholestérol (Figure 11). L'augmentation des concentrations de stérols active LXR. L'activation de LXR peut stimuler l'efflux de cholestérol cellulaire via une expression accrue des transporteurs ABCA1 et peut réduire l'influx de cholestérol en réprimant l'expression de la protéine LDLR, essentielle pour l'absorption du cholestérol LDL et le maintien du taux de cholestérol plasmatique, via l'activation d'IDOL (inducible degrader of LDLR) (Moschetta 2011). Il en résulte une réduction du cholestérol intracellulaire et, en conséquence, une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses et de la croissance tumorale et une induction de l'apoptose.

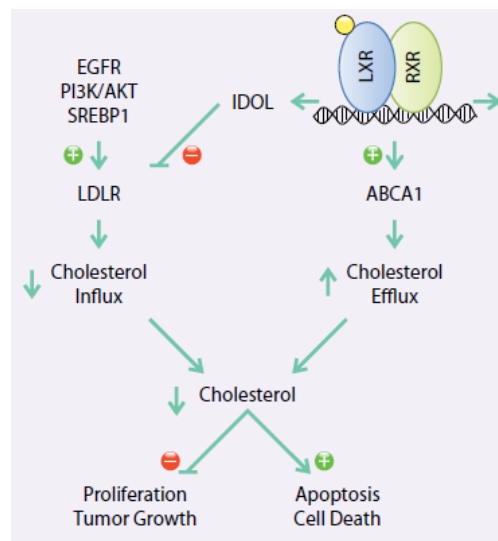


Figure 11. LXR, un régulateur de transcription du métabolisme du cholestérol (Moschetta 2011)

Par ailleurs, il a été démontré que, en réponse à des taux de cholestérol bas, SREBP-2 est activé et favorise la biosynthèse du cholestérol, tandis qu'en réponse à des taux de cholestérol élevés, les LXR sont activés et éliminent l'excès de cholestérol cellulaire. Un lien entre ces deux voies a été mis en évidence. Wong *et al.* ont rapporté que SREBP-2 active la transcription de ABCA1 en générant des ligands endogènes d'oxystérol pour LXR et qu'en l'absence de SREBP-2, l'expression du gène ABCA1 est supprimée (Wong, Quinn, and Brown 2006). Ces résultats révèlent une régulation coordonnée du gène impliqué dans la biosynthèse du cholestérol conjointement avec le gène impliqué dans l'efflux de cholestérol.

c. Molécules ciblant LXR dans le cancer

Les agonistes de LXR augmentent le transport inverse du cholestérol en augmentant l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 impliqués dans l'efflux de cholestérol (Kick *et al.* 2016). En plus de ce qui a été décrit ci-dessus concernant le ciblage de LXR, le ciblage direct des gènes cibles de LXR peut être une stratégie pour moduler la voie de LXR sans activer SREBP.

1.4. Radeaux lipidiques et cancer

Nous venons de détailler les voies de la biosynthèse des acides gras et du cholestérol et l'importance de les cibler en oncologie. Le métabolisme lipidique augmenté dans les cellules cancéreuses est notamment impliqué dans la synthèse des lipides membranaires et en particulier dans la formation de radeaux lipidiques qui constituent de véritables plateformes de signalisation particulièrement actives dans les cellules cancéreuses.

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane plasmique de faible densité, résistants aux détergents et enrichis en cholestérol, en sphingolipides et en protéines ancrées par du glycosylphosphatidylinositol (Dubois *et al.* 2015). Il existe deux types de radeaux lipidiques : les cavéoles contenant des protéines membranaires de la famille des cavéolines et les radeaux non-cavéolaires (ou radeaux planaires) ayant comme marqueurs protéiques les flotillines (Figure 12) (Staubach and Hanisch 2011).

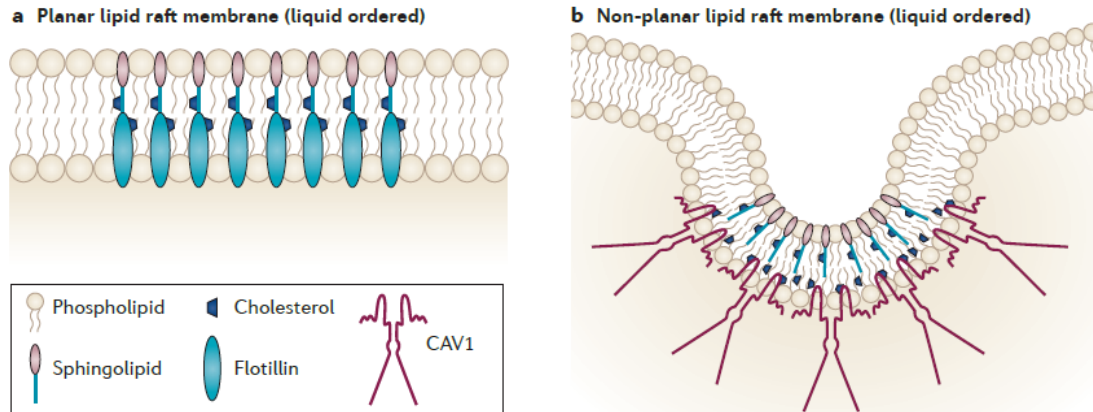


Figure 12. Structure des principaux types de microdomaines membranaires (a- les radeaux planaires ; b- les cavéoles) (Martinez-Outschoorn, Sotgia, and Lisanti 2015)

1.4.1. Régulation des voies de signalisation par les radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques organisent spatialement de nombreux récepteurs et protéines de signalisation et servent de plateformes pour la transduction du signal. Les radeaux lipidiques sont donc impliqués dans la régulation de l'apoptose, la prolifération et la migration cellulaire, ce qui suggère que la perturbation de ces microdomaines (par exemple via une modification de la teneur en cholestérol cellulaire) pourrait être impliquée dans le développement et la progression du cancer (Hager, Solomon, and Freeman 2006).

a. Voie de signalisation associée à l'EGFR

En fait, les radeaux lipidiques servent de plateformes de signalisation pour plusieurs récepteurs du facteur de croissance, tels que les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR), qui sont surexprimés dans de nombreux cancers dont le cancer du sein (Baenke *et al.* 2013 ; Phan, Yeung, and Lee 2014 ; Guéguinou *et al.* 2015). L'EGFR est présent dans les cavéoles et les radeaux non-cavéolaires. L'activation de l'EGFR favorise la prolifération, la croissance et la migration cellulaire et inhibe l'apoptose. La liaison du ligand EGF à l'EGFR entraîne l'activation de différentes voies en aval, y compris les voies MAPK et PI3K/AKT.

La quantité de cholestérol dans la membrane plasmique est un important régulateur de l'EGFR. De nombreuses études ont documenté que la perturbation des radeaux lipidiques par des agents réduisant le cholestérol peut modifier les voies de signalisation (Figure 13) (Hryniewicz-Jankowska *et al.* 2014).

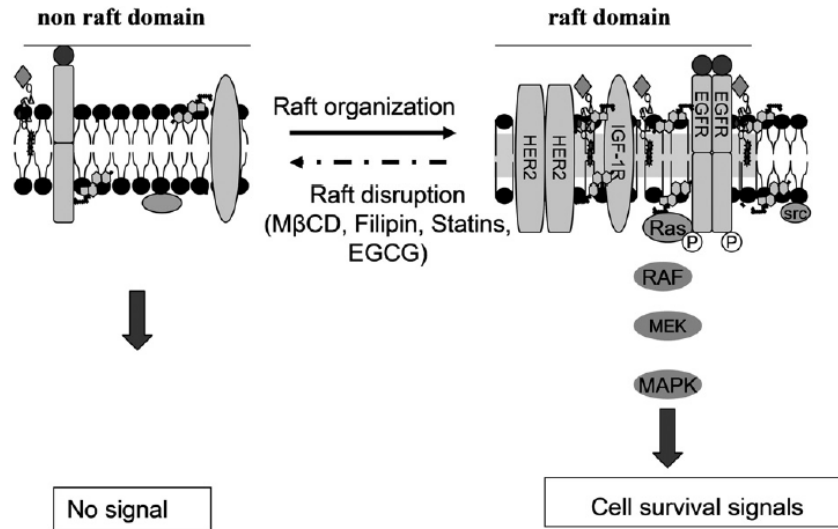


Figure 13. Voie de signalisation EGFR dépendante des radeaux lipidiques (Hryniewicz-Jankowska *et al.* 2014)

Il a été démontré que la perturbation des radeaux lipidiques par la filipine, un agent réduisant le taux de cholestérol, entraîne une inhibition de la phosphorylation de l'EGFR et de l'AKT et une réduction de la survie cellulaire dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate (Zhuang *et al.* 2002). Une autre étude a montré que la perturbation des radeaux lipidiques par la méthyl-β-cyclodextrine induit l'apoptose dans les cellules de carcinome épidermoïde humain A431 et inactive l'AKT indépendamment de l'activation de l'EGFR (Li *et al.* 2006). De plus, les lignées cellulaires du cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) et du cancer de la prostate (PC-3 et LNCaP) étaient sensibles à l'apoptose causée par la perturbation des radeaux lipidiques. Ces données indiquent que la perturbation des radeaux lipidiques par la réduction du cholestérol empêche l'activation du récepteur et entraîne par la suite une inhibition de la croissance cellulaire.

En particulier en ce qui concerne le cancer du sein, les récepteurs des œstrogènes (ER) sont enrichis en radeaux lipidiques et contribuent à la régulation de la croissance cellulaire. L'étude de Márquez *et al.* montre que les ER sont colocalisés avec les récepteurs du facteur de croissance HER1 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 1) et HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) dans les radeaux lipidiques qui régulent les événements en aval conduisant à la phosphorylation des ER dépendante de MAPK et à la croissance cellulaire (Márquez *et al.* 2006).

Les voies de signalisation médiées par les récepteurs localisés dans les radeaux lipidiques sont donc considérées comme une cible thérapeutique.

b. Voie de signalisation de l'apoptose

Les radeaux lipidiques fournissent des plateformes de signalisation capables d'activer les voies de signalisation pro-apoptotique et anti-apoptotique. La perturbation de ces microdomaines provoque l'inhibition de ces voies et peut donc avoir un effet pro- ou anti-apoptotique. La méthyl- β -cyclodextrine, la filipine III et la mévastatine sont des agents connus pour réduire le cholestérol membranaire et perturber les radeaux lipidiques. Bang *et al.* ont montré que la perturbation des radeaux lipidiques de la lignée cellulaire de kératinocytes humains HaCaT par ces composés induit la mort cellulaire apoptotique (Bang, Gniadecki, and Gajkowska 2005). En revanche, il a été rapporté que la méthyl- β -cyclodextrine augmente la viabilité cellulaire et inhibe l'apoptose induite par l'avicine D dans les cellules cancéreuses Jurkat en empêchant la translocation du récepteur de mort Fas dans les radeaux lipidiques et le regroupement de Fas et de son complexe DISC (death-inducing signaling complex) (Xu *et al.* 2009). Ces résultats indiquent que les récepteurs de mort cellulaire, tels que Fas et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), dépendent de la translocation dans les radeaux lipidiques pour induire l'apoptose et qu'en réduisant le cholestérol, l'apoptose est inhibée.

1.4.2. Rôle de la flotilline dans le cancer

Il est intéressant de noter que l'intégrité des radeaux lipidiques est examinée en étudiant l'expression des marqueurs des radeaux lipidiques, en particulier de la famille des protéines de la flotilline qui contient deux membres, la flotilline-1 et la flotilline-2. Ces deux membres se sont avérés impliqués dans le développement et la progression du cancer et la formation de métastases (Berger *et al.* 2013). Plus particulièrement, l'implication de la flotilline-2 dans la progression du cancer a été documentée. En effet, la surexpression de la flotilline-2 a été observée dans les cellules cancéreuses, notamment les cellules cancéreuses du sein, du mélanome et de l'estomac (Hazarika *et al.* 2004 ; Wang *et al.* 2013 ; Banning *et al.* 2014 ; Bodin *et al.* 2014 ; Zhao *et al.* 2014). En outre, il a été rapporté que sa régulation négative est associée à l'inhibition de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules de carcinome gastrique (Cao *et al.* 2014). L'étude de Xie *et al.* montre que le knockdown de la flotilline-2 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses du sein, MCF-7 et MDA-MB-231, en inhibant la phosphorylation de l'AKT et en activant FOXO (un facteur de transcription agissant comme suppresseur de tumeur et régulant l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, p21 et p27) (Xie *et al.* 2015). Ces données confirment que la flotilline-2 est une cible prometteuse pour le traitement du cancer et que l'altération de l'intégrité des radeaux lipidiques dans les cellules cancéreuses constitue une voie intéressante à étudier en oncologie (Li *et al.* 2006).

1.4.3. Molécules ciblant les radeaux lipidiques dans le cancer

Les radeaux lipidiques peuvent être ciblés par la modulation de ses composants principaux (Beloribi-Djefalia, Vasseur, and Guillaumond 2016). Des molécules capables de perturber les radeaux lipidiques et d'induire la mort cellulaire ont récemment été documentées, notamment la méthyl- β -cyclodextrine, l'édelfosine et l'avicine D.

Il a été démontré que la méthyl- β -cyclodextrine déclenche l'apoptose (dégradation de l'ADN, diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, augmentation de l'activité des caspases) dans diverses lignées de cellules cancéreuses par l'épuisement du cholestérol dans les membranes cellulaires (Onodera *et al.* 2013).

L'édelfosine est un alkyl phospholipide synthétique capable d'induire l'apoptose par le biais de radeaux lipidiques. Il a été rapporté qu'il induit l'apoptose par l'activation du récepteur de mort Fas/CD95 indépendante des ligands via son recrutement dans les radeaux lipidiques (Figure 14). Fas/CD95 ne se trouve pas initialement dans les radeaux membranaires. Après traitement des cellules T leucémiques Jurkat avec de l'édelfosine, cette dernière s'accumule dans les radeaux lipidiques, permettant le recrutement de Fas/CD95 dans ces microdomaines (Gajate, Gonzalez-Camacho, and Mollinedo 2009). L'édelfosine induit ensuite la formation de DISC constitué de Fas/CD95, de la molécule adaptatrice FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et de la procaspase-8, dans les radeaux lipidiques. Cela favorise l'activation de la caspase-8 et donc l'apoptose.

L'avicine D, qui est un dérivé triterpénique d'origine végétale, induit également l'apoptose par la translocation du récepteur de mort Fas dans les radeaux lipidiques et le recrutement des autres protéines pro-apoptotiques dans ces microdomaines constituant le complexe DISC (Xu *et al.* 2009).

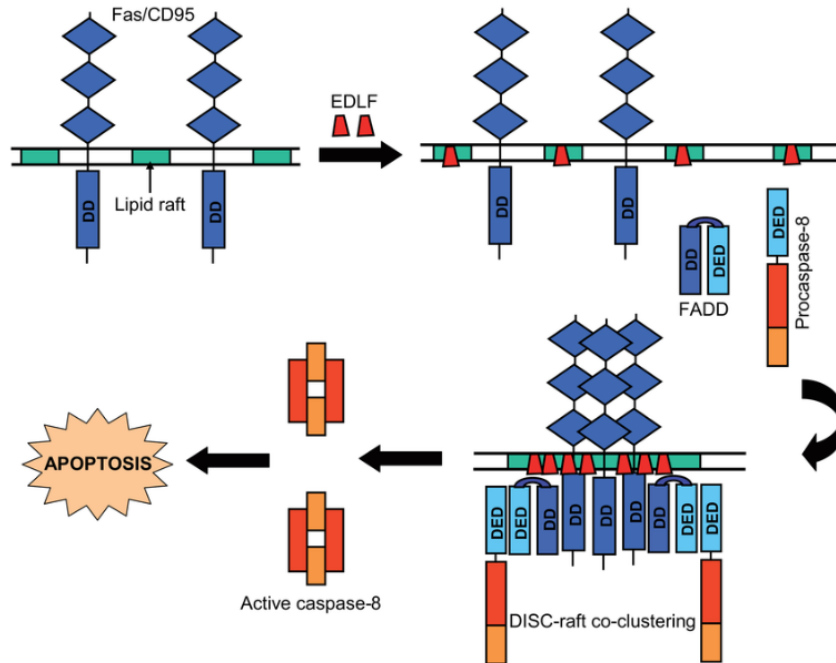


Figure 14. Régulation de l'apoptose à travers les radeaux membranaires (Gajate, Gonzalez-Camacho, and Mollinedo 2009)

Il a également été démontré que l'édelfosine perturbe les radeaux lipidiques en inhibant les voies de signalisation. Le traitement des cellules du lymphome à l'édelfosine permet son accumulation dans les radeaux lipidiques, ce qui provoque le déplacement de PI3K, AKT, PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1) et mTOR/PDK2 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2) hors des radeaux (Figure 15) (Reis-Sobreiro *et al.* 2013). L'interaction de l'édelfosine avec les radeaux provoque aussi une inhibition de la phosphorylation de l'AKT et des substrats, une perte de potentiel mitochondrial et une dégradation de l'ADN, conduisant finalement à l'apoptose.

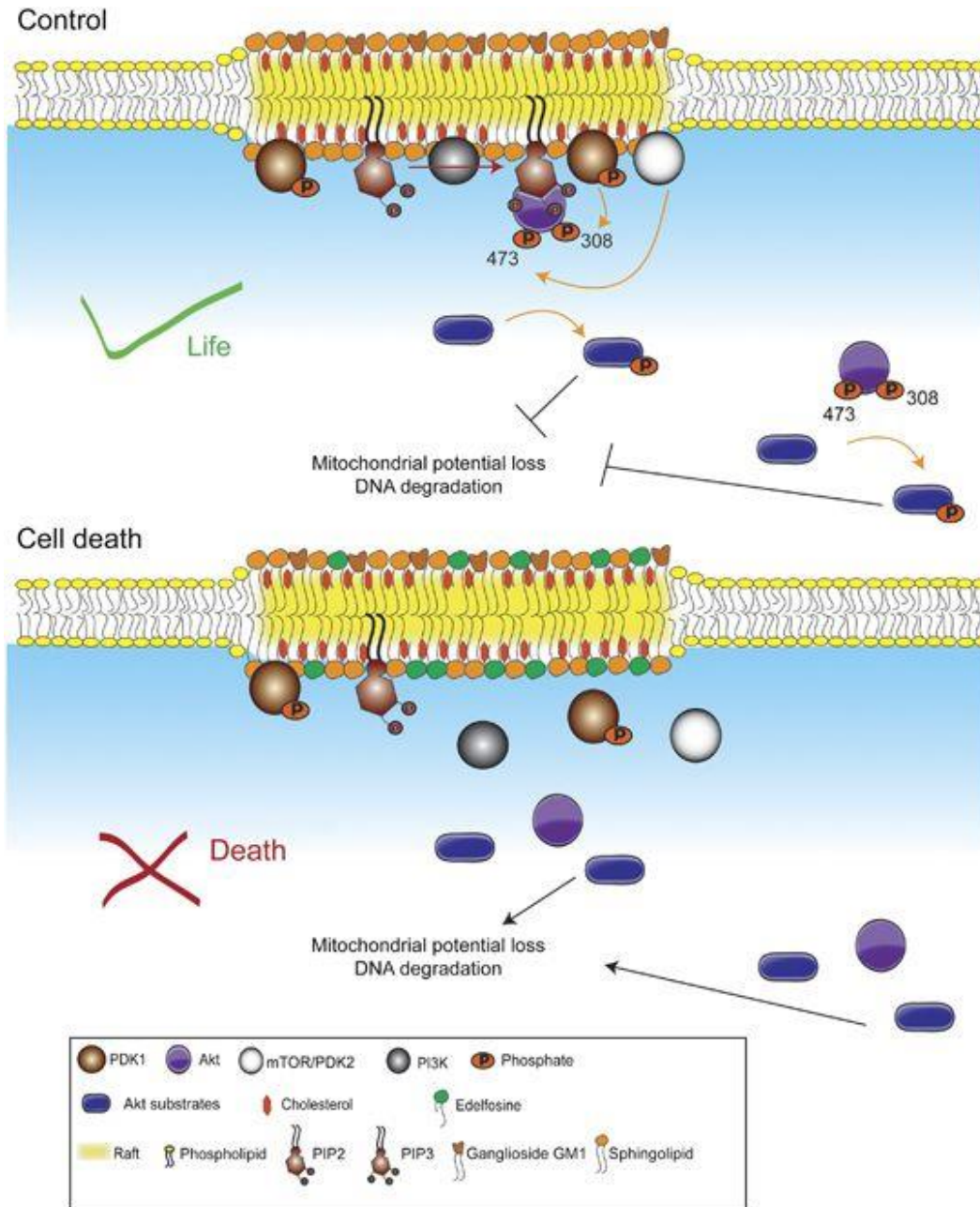


Figure 15. Schéma de la voie de signalisation PI3K/AKT médiée par les radeaux lipidiques (Reis-Sobreiro et al. 2013)

Outre les composés mentionnés ci-dessus, il a été montré que LXR pouvait moduler la signalisation des radeaux lipidiques et constitue donc une cible thérapeutique potentielle. Pommier *et al.* ont montré que le traitement des cellules cancéreuses de la prostate LNCaP avec l'agoniste de LXR, T0901317, diminue la phosphorylation de l'AKT nécessaire à la survie cellulaire et induit ainsi l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (Pommier *et al.* 2010). L'activation de LXR augmentait également l'expression de ABCG1 et diminuait

ainsi le cholestérol cellulaire, entraînant une réduction de la taille des radeaux. Ces données montrent que la stimulation du transport inverse du cholestérol par LXR entraîne une perturbation des radeaux lipidiques et une régulation négative des voies de signalisation associées à ces microdomaines dans les cellules cancéreuses.

Points clés

- *La biosynthèse accrue des acides gras et du cholestérol est l'une des plus importantes caractéristiques métaboliques des cellules cancéreuses.*
- *Les enzymes clés impliquées dans ces deux voies, telles que ACC1, FASN, SCD1 et HMGCR, sont surexprimées dans les cellules cancéreuses.*
- *SREBP est le principal activateur des gènes de ces deux voies de biosynthèse.*
- *L'accumulation de cholestérol intracellulaire s'est révélée être davantage liée aux cancers.*
- *L'activation de LXR stimule l'efflux de cholestérol en augmentant l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1, entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire.*
- *Les microdomaines membranaires enrichis en cholestérol, appelés radeaux lipidiques, sont impliqués dans les voies de signalisation de la progression du cancer.*
- *Cibler le métabolisme lipidique des cellules cancéreuses constitue une stratégie thérapeutique prometteuse dans la lutte contre le cancer.*

2. Approche bioguidée

Le fractionnement bioguidé est une stratégie fréquemment utilisée dans la découverte de nouveaux composés bioactifs aux applications pharmaceutiques potentielles. Le principe repose sur l'évaluation biologique de toutes les fractions obtenues à chaque étape de fractionnement chromatographique. Seules les fractions les plus actives sont sélectionnées pour la suite des essais, permettant d'aboutir à l'isolement du (ou des) métabolite(s) bioactif(s) (Atta-ur-Rahman, Choudhary, and Thomsen 2001). Le but de ces essais biologiques est de sélectionner rapidement des fractions présentant une activité biologique intéressante : les essais doivent donc être simples, rapides et peu coûteux. Dans le domaine du cancer, les tests de cytotoxicité cellulaire *in vitro*, tels que le test MTT (bromure de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphényl Tétrazolium), sont les plus couramment utilisés.

La figure ci-après illustre le principe de l'isolement bioguidé de composés bioactifs à partir de sources naturelles (plantes, micro-organismes, organismes marins) (Figure 16) (Sarker 2005). L'extrait brut est

initialement séparé en plusieurs fractions en utilisant différentes techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur colonne ouverte et la chromatographie liquide sous vide. Il est préférable de ne pas récupérer trop de fractions du premier fractionnement, sinon le composé bioactif d'intérêt se dispersera dans de nombreuses fractions. Des fractionnements plus fins sont ensuite effectués et chaque étape de séparation est suivie d'un test biologique pour sélectionner les fractions les plus actives en laissant de côté celles qui n'ont pas montré d'activité. Une fois le composé d'intérêt isolé, sa structure est établie par des méthodes spectroscopiques, telles que la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie infrarouge et la spectrométrie de masse à haute résolution (Sarker 2005).

Cependant, plusieurs difficultés peuvent apparaître lors des étapes de séparation : une masse trop faible peut empêcher de poursuivre un fractionnement, des problèmes de solubilité de composés peuvent limiter les techniques utilisées. L'activité biologique peut également être perdue ou réduite pendant les étapes de purification, soit parce que le composé bioactif est instable dans les conditions utilisées, soit parce que l'activité de l'extrait brut était initialement due à une action synergique entre plusieurs composés (Sarker 2005). De plus, des composés actifs mais minoritaires peuvent être difficiles à détecter dans une fraction contenant de nombreux composés inactifs.

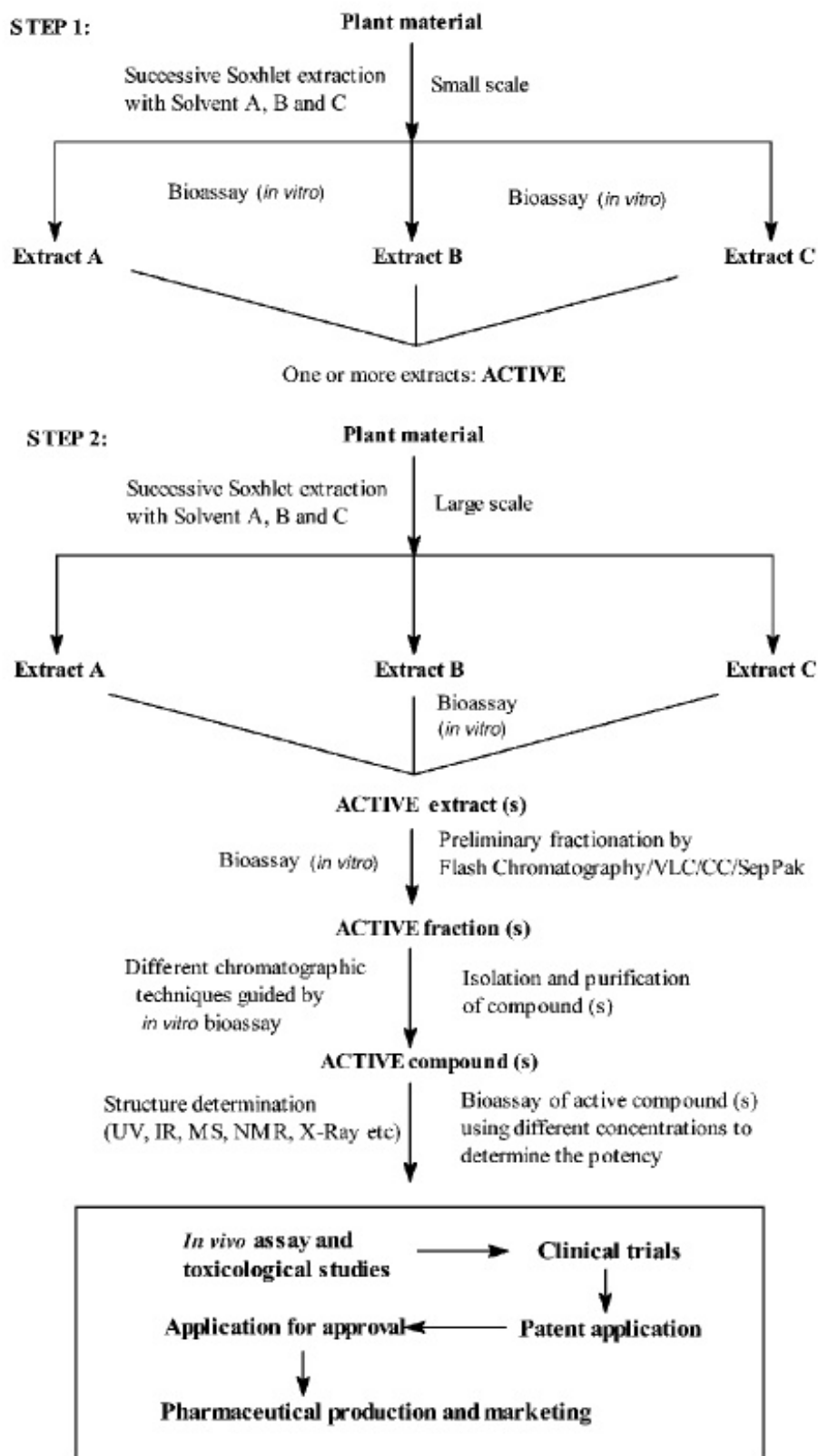


Figure 16. Schéma de fractionnement bioguidé de produits naturels (Sarker 2005)

Enfin, les recherches s'étant intensifiées ces dernières années, la probabilité de détecter des molécules déjà connues n'est pas négligeable. C'est pourquoi le fractionnement bioguidé est aujourd'hui fréquemment associé à la déréplication : la présence de molécules déjà connues est recherchée par les outils à disposition (spectre ultraviolet, spectrométrie de masse à haute résolution, résonance magnétique nucléaire). Cette technique requiert donc de combiner à la fois des critères taxonomiques, des données d'activité(s) biologique(s), des caractéristiques physico-chimiques pour les comparer à une base de données. Lorsque les techniques déréplicatives peuvent être appliquées, un temps précieux peut être gagné en se focalisant sur la purification de pics chromatographiques non identifiés dans les bases de données, ou au contraire en n'allant pas jusqu'à la purification d'une molécule déjà identifiée mais en apportant de nouveaux éléments concernant son mécanisme d'action par exemple.

Points clés

• *Le fractionnement bioguidé est un processus de séparation utilisé dans la recherche de nouveaux composés biologiquement actifs. Chaque étape de fractionnement est suivie de tests biologiques afin de sélectionner les fractions les plus actives, ce qui permet d'isoler et d'identifier rapidement les composés bioactifs. La déréplication est aujourd'hui nécessaire afin d'orienter efficacement les stratégies de recherche.*

3. Le milieu marin, source de composés originaux et bioactifs

Malgré des progrès remarquables dans le traitement du cancer, la recherche de nouveaux composés anticancéreux plus efficaces, plus spécifiques et générant moins d'effets indésirables se poursuit. Ainsi, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux produits naturels marins comme alternative possible aux sources naturelles couramment étudiées (Newman 2008).

Au cours des dernières décennies, une attention particulière a été portée au milieu marin, principalement en raison de sa superficie importante (couvrant près de 70% de la planète), de sa grande biodiversité (95% de la biosphère) et de ses conditions environnementales particulières (température, salinité, pression, ...) (Dalmaso, Ferreira, and Vermelho 2015). Le postulat selon lequel le milieu marin constituerait un riche réservoir de candidats-médicaments repose sur la capacité des organismes marins à synthétiser des molécules structurellement uniques en réponse à leur environnement (Newman and Cragg 2016). L'étude des composés marins a commencé dans les années 1950 et s'est intensifiée au cours des dernières années (Alves *et al.* 2018), comme le reflète le nombre croissant de publications

scientifiques ayant trait à ce domaine. A ce jour, environ 30 000 produits naturels d'origine marine ont été découverts (Figure 17) et se sont avérés posséder diverses activités biologiques, notamment antitumorales, antioxydantes, antivirales, antibactériennes et anti-inflammatoires.

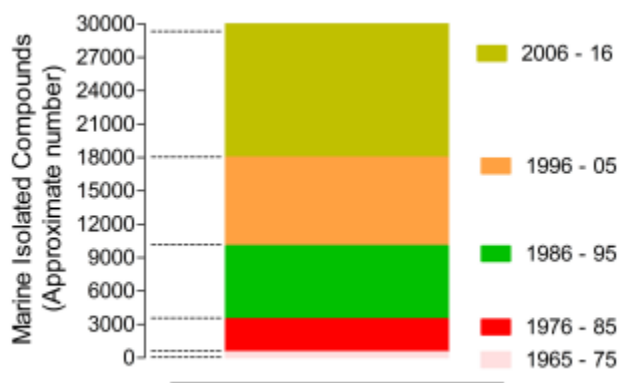


Figure 17. Nombre approximatif de composés marins isolés au cours des 50 dernières années (Alves et al. 2018)

Malgré le nombre de composés isolés à partir d'organismes marins et l'activité cytotoxique associée à certains, et compte tenu des médicaments marins approuvés ou en cours d'essais cliniques, il convient de noter que la bioprospection marine en est encore à ses débuts (Jaspars et al. 2016).

4. Les macroalgues marines

Parmi les organismes marins étudiés jusqu'à présent, le potentiel cytotoxique des macroalgues marines a suscité un grand intérêt chez les chercheurs. Selon Alves et al., les algues arrivent en troisième position des organismes producteurs de molécules, toute activité biologique confondue, après la catégorie des éponges, et la catégorie des micro-organismes et phytoplancton. Parmi les algues, les algues rouges constituent la principale source de molécules isolées (Alves et al. 2018).

4.1. Caractéristiques générales

Les macroalgues marines constituent un groupe hétérogène d'organismes macroscopiques et pluricellulaires qui vivent dans les eaux marines. Elles sont photosynthétiques. Les macroalgues sont non vasculaires et se distinguent des plantes vasculaires par l'absence de racines, de tiges et de feuilles (Zerrifi et al. 2018). Au lieu de cela, elles se composent d'un thalle, un corps végétatif non différencié, et d'un stipe, une fausse-tige reliée à un substrat par un crampon et suivie d'une fronde. La plupart vivent

sur un support, mais certaines peuvent être pélagiques. Leur texture est très variable, elles peuvent être gélifiées, cartilagineuses ou spongieuses.

Il existe actuellement environ 10 000 espèces d'algues classées en trois divisions en fonction de leur composition en pigments (O'Sullivan *et al.* 2010 ; Fleurence and Levine 2016) :

- Les Chlorophytes ou algues vertes : comprenant 1 500 espèces, elles ont une couleur verte en raison de la présence prédominante de chlorophylle a et de chlorophylle b (Yende, Harle, and Chaugule 2014 ; Zerrifi *et al.* 2018) ; quelques exemples : *Ulva*, *Enteromorpha* et *Codium*.
- Les Phéophytes ou algues brunes : composées de 2 000 espèces, elles contiennent principalement de la fucoxanthine qui masque la chlorophylle a et la chlorophylle c, ce qui leur confère une couleur brune (Yende, Harle, and Chaugule 2014 ; Zerrifi *et al.* 2018). *Sargassum*, *Fucus* et *Cystoseira* sont des exemples d'algues brunes.
- Les Rhodophytes ou algues rouges : comprenant 6 500 espèces, elles contiennent deux pigments principaux, la phycocyanine et la phycoérythrine, en plus de la chlorophylle a, la chlorophylle d et les caroténoïdes (Yende, Harle, and Chaugule 2014 ; Zerrifi *et al.* 2018) ; quelques exemples : *Corallina*, *Laurencia* et *Jania*.

En fait, les macroalgues marines sont toujours considérées comme des ressources sous-exploitées, bien qu'elles soient utilisées depuis longtemps comme aliments fonctionnels et dans les régimes alimentaires, principalement dans les pays asiatiques tels que la Chine et le Japon (Moussavou *et al.* 2014). Elles ont également été utilisées dans ces pays en médecine traditionnelle pour traiter la carence en iode, les troubles intestinaux, les infestations des vers, ainsi que comme agents hypocholestérolémiants et hypoglycémiant (El Gamal 2010). En outre, ces organismes marins ont des effets bénéfiques sur la santé humaine contre les maladies cardiovasculaires, le diabète et le cancer (Bouga and Combet 2015). En fait, des études épidémiologiques menées au Japon ont montré que l'incidence du cancer du sein chez les femmes consommant régulièrement des algues était faible (Teas *et al.* 2013).

4.2. Composition biochimique

La composition biochimique des algues marines varie selon plusieurs facteurs tels que les espèces et les conditions environnementales. D'une manière générale, elles ont une faible teneur en lipides mais sont riches en acides gras polyinsaturés, en fibres alimentaires solubles, en minéraux (sodium, calcium,

magnésium, potassium, phosphore, fer, iode), en vitamines (B12, C, E), en polysaccharides, en protéines et en acides aminés essentiels. A ce jour, de nombreuses études ont montré leur intérêt potentiel en santé, grâce à des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques et cytotoxiques (Smit 2004 ; El Gamal 2010 ; Yende, Harle, and Chaugule 2014).

4.3. Activité cytotoxique des macroalgues marines

L'isolement et la caractérisation des composés cytotoxiques des macroalgues marines ont fait l'objet de nombreuses études. Dans ce contexte, quelques composés d'algues présentant des activités cytotoxiques avec des mécanismes cellulaires différents sont décrits ci-dessous.

En général, un composé cytotoxique agit en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses et peut souvent tuer les cellules en activant des voies de signalisation intracellulaires menant à l'apoptose (Liu *et al.* 2015). Le ciblage du cycle cellulaire dans le cancer est une autre stratégie dans le traitement du cancer. Le clerostérol, un stérol isolé de l'algue verte *Codium fragile*, inhibe la croissance des cellules de mélanome humain A2058 et induit l'apoptose, comme en témoigne la fragmentation de l'ADN, l'augmentation du nombre de cellules en sub-G1, la présence de corps apoptotiques, la perte du potentiel membranaire mitochondrial, l'activation des caspases-3 et -9, l'augmentation de l'expression de Bax et la diminution de l'expression de Bcl-2 (Kim *et al.* 2013). L'étude de Park *et al.* a montré que la laminarine, un polysaccharide isolé de l'algue brune *Laminaria digitata*, induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du côlon humain HT-29, entraînant une perte du potentiel de la membrane mitochondriale, une diminution de l'expression de Bcl-2, une augmentation de l'expression de Bax et Bad et une libération du cytochrome c (Park *et al.* 2013). La laminarine augmente également le pourcentage de cellules dans les phases sub-G1 et G2/M, diminue l'expression de Cdk2 (Cyclin-dependent kinase 2), Cdk6 (Cyclin-dependent kinase 6), pRb et c-myc et augmente celle de p27, arrêtant ainsi le cycle cellulaire. De plus, ce polysaccharide inhibe l'activation de la voie de signalisation EGFR impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire.

L'angiogénèse est un processus essentiel pour la croissance tumorale et les métastases. Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) est un facteur angiogénique et donc une cible prometteuse pour le traitement du cancer (Ichihara, Kiura, and Tanimoto 2011). L'acide (E)-9-oxooctadec-10-énoïque (C10) isolé de l'algue rouge *Gracilaria verrucosa* (Furuno *et al.* 2011) et le fucodiphloroéthol G, un phlorotannin de l'algue brune *Ecklonia cava* (Li *et al.* 2011), sont des exemples de composés d'algues qui inhibent l'activité du VEGF et induisent donc un

effet anti-angiogénique. Les métalloprotéinases matricielles (MMP, Matrix Metalloproteinase) sont associées aux métastases tumorales et à l'angiogénèse. Par conséquent, le ciblage des MMP est une stratégie qui pourrait inhiber les métastases et l'angiogénèse (Lv *et al.* 2018). Le fucodiphloroethol G de l'algue brune *Ecklonia cava* (Li *et al.* 2011) et le tubérolide B, un méroterpénoïde isolé de l'algue brune *Sargassum macrocarpum* (Choi *et al.* 2017) sont deux exemples de composés qui inhibent les MMP sécrétées par les cellules cancéreuses et réduisent les métastases.

Le tableau ci-après montre d'autres composés chimiques isolés à partir d'algues marines ayant une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses (Tableau 1). Les composés mentionnés ci-après ne sont que quelques exemples parmi les nombreux isolés des macroalgues marines possédant des activités cytotoxiques. Néanmoins, comme le montre le Tableau 1, les composés cytotoxiques identifiés des algues vertes, brunes et rouges appartiennent à différentes classes chimiques telles que les lipides (glycolipides, sulfolipides), les protéines (glycoprotéines), les polysaccharides, les alcaloïdes, les terpènes (sesquiterpènes, diterpènes, caroténoïdes), les composés phénoliques (phlorotannins, polyphénols). Leur grande biodiversité et la diversité de leur composition biochimique font des macroalgues marines une riche source de composés cytotoxiques, à différents mécanismes d'action et prometteurs pour le développement de nouveaux agents anticancéreux.

Tableau 1. Quelques composés à activité cytotoxique isolés à partir de macroalgues marines

Composé	Classe chimique	Algue	Cellules cancéreuses ciblées	Référence
Sulfoquinovosyldiacylglycérol	Sulfolipide	<i>Porphyra yezoensis</i> (algue rouge)	DLD-1 (côlon)	(Eitsuka <i>et al.</i> 2004)
Laurenditerpenol	Diterpène	<i>Laurencia intricata</i> (algue rouge)	T-47D (sein)	(Mohammed <i>et al.</i> 2004)
Lophocladine B	Alcaloïde	<i>Lophocladia</i> sp. (algue rouge)	NCI-H460 (poumon) MDA-MB-435 (sein)	(Gross <i>et al.</i> 2006)
Nigricanoside A	Glycolipide	<i>Avrainvillea nigricans</i> (algue verte)	MCF-7 (sein) HCT-116 (côlon)	(Williams <i>et al.</i> 2007)
Elatol	Sesquiterpène	<i>Laurencia microcladia</i> (algue rouge)	B16F10 (mélanome murin) A549 (poumon) DU145 (prostate) L929 (fibroblaste murin) MCF-7 (sein)	(Campos <i>et al.</i> 2012)
Diphlorethohydroxycarmalol	Phlorotannin	<i>Ishige okamurae</i> (algue brune)	HL60 (leucémie promyélocytaire)	(Kang <i>et al.</i> 2012)
Dieckol	Polyphénol	<i>Ecklonia cava</i> (algue brune)	HT1080 (fibrosarcome)	(Park and Jeon 2012)
HFGP	Glycoprotéine	<i>Hizikia fusiformis</i> (algue brune)	HepG2 (foie)	(Ryu <i>et al.</i> 2012)
Fucoxanthine	Caroténoïde	<i>Undaria pinnatifida</i> (algue brune)	HepG2 (foie)	(Liu, Lim, and Hu 2013)
Fucoïdane	Polysaccharide sulfaté	<i>Undaria pinnatifida</i> (algue brune)	SMMC-7721 (foie)	(Yang <i>et al.</i> 2013)

4.4. Etat de l'art des connaissances sur les macroalgues marines de la côte libanaise

Les macroalgues marines de la côte libanaise sont peu explorées quant à la production de composés structurellement innovants et biologiquement valorisables en thérapeutique. Peu de chercheurs se sont intéressés à la recherche de nouveaux composés naturels bioactifs à partir des algues de la côte libanaise, prenons quelques exemples :

Sokolova *et al.* ont isolé des polysaccharides communs, l'acide alginique et le fucoïdane, de deux algues brunes, *Dictyopteris polypodioides* et *Sargassum* sp. (Sokolova *et al.* 2011). Le fucoïdane inhibait la croissance de colonies de cellules de mélanome humain RPMI-7951. L'acide alginique n'a pas été testé pour son activité biologique. L'étude de Men'shova *et al.* était presque similaire à l'étude précédente. Le fucoïdane extrait de l'algue brune *Padina pavonica* présentait aussi une activité inhibitrice sur la croissance de colonies de cellules de mélanome humain RPMI-7951 (Men'shova *et al.* 2012).

Un galactane sulfaté et un carraghénane ont été extraits de l'algue rouge *Pterocladia* sp. (Sebaaly *et al.* 2012). Le galactane avait des effets antioxydants et anticoagulants plus importants que le carraghénane. De même, dans une autre étude, Sebaaly *et al.* ont extrait un galactane sulfaté et un carraghénane de l'algue rouge *Corallina* et ont également montré que ces deux polysaccharides présentaient des activités anticoagulantes et antibactériennes (Sebaaly *et al.* 2014).

Dans une autre étude, Karaki *et al.* ont isolé différents polysaccharides (alginate de sodium, mannuronane et une fraction constituée de fucoïdane, laminarane et mannurorane) de l'algue brune *Dictyopteris polypodioides* (Karaki *et al.* 2013). Le mannuronane et la fraction possédaient des activités antioxydantes et anticoagulantes.

Ce petit bilan met en avant d'une part que les macroalgues de la côte libanaise sont peu étudiées et d'autre part que les principales études se limitent aux composés d'algues classiques, principalement les polysaccharides.

4.5. Le genre *Laurencia*

Lamouroux a décrit le genre *Laurencia* pour la première fois en 1813, le dédiant au scientifique français M. de la Laurencie ("*Laurencia* J.V.Lamouroux, 1813, Algaebase").

En raison de sa grande diversité chimique, les macroalgues rouges du genre *Laurencia* sont l'un des organismes les plus étudiés dans le milieu marin (Bawakid *et al.* 2017). Elles appartiennent à l'ordre des Cérámiales, famille des Rhodomelaceae, classe des Rhodophyceae, tribu Laurencieae et comprennent

actuellement 146 espèces acceptées taxonomiquement. Elles sont très répandues et se trouvent principalement dans les eaux côtières tropicales, subtropicales et tempérées, la plupart étant distribuées dans l'hémisphère sud. La couleur des algues rouges dépend de leur emplacement. Les algues qui se trouvent en profondeur présentent leur couleur originale rouge, car la phycoérythrine peut absorber la lumière à cette profondeur. Alors qu'en surface, elles sont plutôt vertes car la quantité du pigment rouge diminue. Le genre *Laurencia* présente un thalle dressé et ramifié bilatéralement ou dans toutes les directions (Harizani, Ioannou, and Roussis 2016). Il possède un crampon discoïde à rhizoïde leur permettant de s'ancrer à leur substrat. Les axes ramifiés du thalle peuvent être cylindriques ou plats, et les rameaux ultimes peuvent être émoussés ou tronqués ou souvent claviformes.

Les espèces du genre *Laurencia* sont connues pour être les producteurs les plus prolifiques de métabolites secondaires structurellement uniques parmi toutes les macroalgues marines (Harizani, Ioannou, and Roussis 2016). La majorité de ces métabolites sont halogénés, contenant des atomes de brome, du chlore et, dans certains cas de l'iode (Harizani, Ioannou, and Roussis 2016). Une fois extraits, ils se trouvent principalement dans les fractions non polaires ou moyennement polaires. Fait intéressant, le genre *Laurencia* possède des organites intracellulaires spécifiques, appelés corps de cerise, et identifiés comme site de stockage principal pour les composés halogénés (Harizani, Ioannou, and Roussis 2016). Certains de ces métabolites se sont avérés présenter diverses activités biologiques importantes, telles que cytotoxiques, anti-inflammatoires, antipaludiques, antivirales, antifongiques et antibactériennes (Topcu *et al.* 2003 ; Vairappan *et al.* 2008 ; Cen-Pacheco *et al.* 2011b ; Alarif *et al.* 2012 ; Harizani, Ioannou, and Roussis 2016). Par conséquent, ces algues pourraient avoir un grand potentiel pour le développement de médicaments destinés au traitement de maladies humaines telles que le cancer. Les principaux métabolites déjà isolés de ce genre sont les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les C15 acétogénines.

L'étude sur les métabolites secondaires de *Laurencia* a débuté avec un rapport d'Obota et de Fukushi en 1953 montrant que les sesquiterpénoïdes sont les principaux composants de *L. glandulifera* (Scheuer 2013). Puis, en 1965, Irie *et al.* ont isolé et identifié la laurencine, la première C15 acétogénine, à partir de la même espèce algale (Irie, Suzuki, and Masamune 1965). Depuis lors, de nombreux chercheurs ont suivi le même objectif pour isoler et identifier les différents composants de *Laurencia* et aujourd'hui, *Laurencia* est reconnue comme le genre d'algues le plus étudié, comme en témoigne le grand nombre d'articles scientifiques publiés.

De nombreux métabolites isolés et identifiés du genre *Laurencia* ont été testés pour leur potentiel cytotoxique sur les cellules cancéreuses ; un répertoire de métabolites qui se veut aussi exhaustif que possible est présenté dans un tableau en annexe 1 à la fin de ce manuscrit, il présente les métabolites de différentes espèces de *Laurencia*, leur structure, leur classe chimique et leur activité cytotoxique dans différents modèles *in vitro*. Comme nous le remarquons, la chimie de *Laurencia* est dominée par la présence de sesquiterpènes avec des squelettes de carbone variés. Outre les sesquiterpènes qui représentent la principale classe chimique de ce genre, les triterpènes, les diterpènes, les C15 acétogénines, les indoles, les stéroïdes et les aldéhydes ont été identifiés comme métabolites cytotoxiques. De plus, nous notons que les espèces de *Laurencia* à partir desquelles les métabolites bioactifs ont été isolés ont une distribution mondiale.

Les études répertoriées dans le tableau de l'annexe 1 montrent uniquement l'activité cytotoxique de métabolites sur diverses lignées de cellules cancéreuses humaines ou murines sans égard à leurs mécanismes d'action moléculaires. Généralement, les tests de cytotoxicité cellulaire *in vitro*, tels que le test MTT, sont les plus utilisés pour évaluer l'activité cytotoxique préliminaire des métabolites. En effet, peu d'études se sont intéressées à la compréhension du mécanisme d'action des métabolites cytotoxiques de *Laurencia*, voici quelques exemples.

L'étude de Matsuzawa *et al.* a montré que le thyriferyl 23-acetate (Figure 18), un triterpène bromé isolé de *L. obtusa*, diminue la viabilité de différentes lignées de cellules leucémiques humaines T et B et induit l'apoptose (Matsuzawa *et al.* 1999).

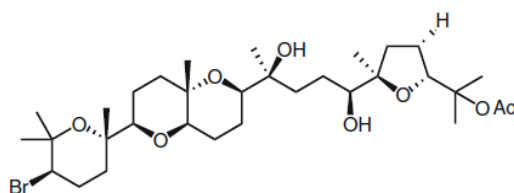


Figure 18. Thyriferyl 23-acetate

L'hypoxie tumorale est l'une des caractéristiques du cancer. HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) est un facteur de transcription surexprimé dans de nombreux cancers humains. Le laurenditerpenol (Figure 19), un diterpène de *L. intricata*, inhibe l'activation de HIF-1 par l'hypoxie dans les cellules de cancer du sein humain T-47D et l'induction de gènes cibles de HIF-1, en particulier du facteur angiogénique VEGF sécrété par l'hypoxie (Mohammed *et al.* 2004).

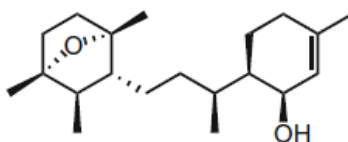


Figure 19. Laurenditerpenol

Kim *et al.* ont montré que l'extrait de *L. okamurai* contenant du laurinterol (Figure 20) inhibe la viabilité des cellules de mélanome B16F1 et induit l'apoptose. De plus, le traitement des cellules avec ce sesquiterpène augmentait l'activité transcriptionnelle de p53 ainsi que le niveau d'expression de phospho-p53. Par conséquent, il a été suggéré que l'extrait de *L. okamurai* contenant du laurinterol peut induire l'apoptose dans les cellules de mélanome par une voie dépendante de p53 (Kim, Mendis, and Kim 2008).

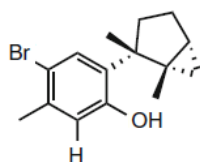
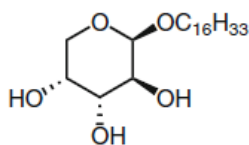


Figure 20. Laurinterol

L'hexadecyl-1-O- α -L-arabinopyranoside (Figure 21), un glycolipide isolé de *L. majuscula*, s'est avéré inhiber la prolifération cellulaire des lignées cellulaires LOVO (côlon humain) et BEL-7402 (hépatocellulaire humaine). En outre, il a été montré qu'il bloquait le cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules LOVO traitées (Du *et al.* 2010).

Figure 21. Hexadecyl-1-O- α -L-arabinopyranoside

Le triterpène bromé thysiferol (Figure 22) isolé de *L. thysifera* a été trouvé pour inhiber l'activation de HIF-1 induite par l'hypoxie dans les cellules du cancer du sein T-47D et de réduire les taux d'ARNm des gènes cibles de HIF-1, VEGF et GLUT1 (glucose transporter-1). Il était également capable de supprimer la consommation d'oxygène et la respiration mitochondriale en inhibant le complexe I de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Mahdi *et al.* 2011).

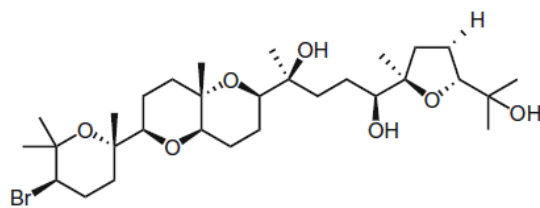


Figure 22. Thysiferol

Campos *et al.* ont trouvé que l'elatol (Figure 23), un sesquiterpène bromé et chloré isolé de *L. microcladia*, réduit la viabilité cellulaire du mélanome murin B16F10 et affecte la progression du cycle cellulaire. Ce sesquiterpène induit également l'apoptose cellulaire et réduit la croissance tumorale chez les souris C57Bl6 *in vivo* (Campos *et al.* 2012).

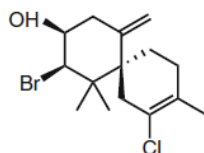


Figure 23. Elatol

L'inhibition de l'efflux de médicament induit par la glycoprotéine P (P-gp), un transporteur transmembranaire impliqué dans le phénomène de multirésistance des cellules cancéreuses aux médicaments, est reconnue comme une cible intéressante pour le traitement des maladies. Huang *et al.* ont montré que le parguerol 7,16-diacétate et le parguerol triacétate (Figure 24) isolés de *L. filiformis*, agissent en tant qu'inhibiteurs de la P-gp dans les cellules cancéreuses multirésistantes du côlon humain (SW620 Ad300). Cela se traduit par une augmentation de l'accumulation intracellulaire de deux substrats de la P-gp, calcéine AM et Hoechst 33342, après traitement des cellules cancéreuses avec ces diterpènes (Huang *et al.* 2013).

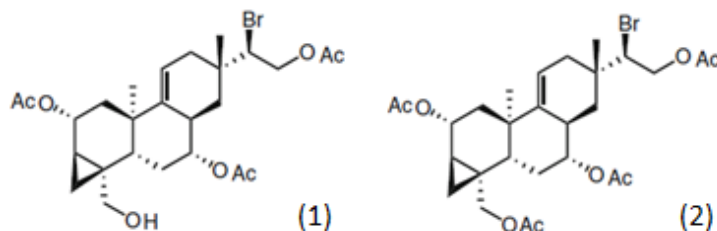


Figure 24. Parguerol 7,16-diacetate (1) et parguerol triacetate (2)

Bien que le genre *Laurencia* ait été intensivement étudié au cours des 50 dernières années, de nombreux nouveaux métabolites sont encore signalés, tels que :

- Les sesquiterpènes, snakeol et snakediol, isolés de *L. snackeyi* et présentant une activité antibactérienne (Kamada and Vairappan 2017).
- Les sesquiterpènes, omphalourediol, rhodolaurenones B et C de *L. majuscula*, les deux derniers composés possédant une activité antibactérienne (Kamada, Phan, and Vairappan 2017b).
- Les C15 acétogénines nangallenes A et B isolés de *L. nangii* et montrant une activité antifongique (Kamada, Phan, and Vairappan 2017a).
- Les C15 acétogénines et sesquiterpènes cytotoxiques énumérés à la fin du tableau de l'annexe 1 (Bawakid *et al.* 2017 ; Yu *et al.* 2017 ; Barcellos Marini *et al.* 2018).
- Deux C15 acétogénines et un diterpène isolés de *L. obtusa* (le nom des métabolites n'est pas mentionné) (Esselin *et al.* 2018).

• ***Laurencia papillosa* (C. Agardh) Greville, 1830**

Laurencia papillosa (Figure 25) est une espèce de petite taille (une dizaine de centimètres) avec un thalle érigé et de consistance cartilagineuse. L'algue est formée d'un axe central cylindrique qui porte plusieurs rameaux latéraux recouverts de nombreuses papilles denses. Elle est très abondante sur les côtes rocheuses (attachée aux rochers par un crampon en forme de disque) et apparaît donc de couleur verte. La plupart sont recouvertes d'épiphytes (*Jania rubens*, *Ulva compressa*).



Figure 25. *Laurencia papillosa*

Il a été rapporté que *Laurencia papillosa* produit divers métabolites naturels potentiellement bioactifs tels que des composés aromatiques, des C15 acétogénines, des stéroïdes, des sesquiterpènes et autres. De nombreuses études ont été consacrées à l'évaluation de l'activité cytotoxique d'extraits, de fractions et de composés de *Laurencia papillosa*. En voici quelques exemples.

L'étude d'El Baroty *et al.* a mis en évidence l'activité cytotoxique de la fraction glycolipidique de *L. papillosa* de la Mer Rouge sur les cellules de carcinome hépatocellulaire humain (HepG2) et

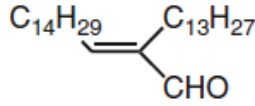
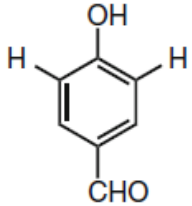
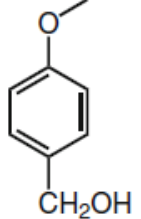
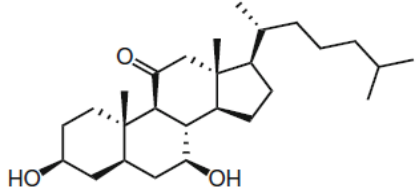
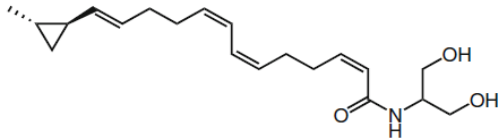
d'adénocarcinome du sein (MCF-7) avec une CI_{50} de 0,67 et 0,87 $\mu\text{g/mL}$ respectivement après 48 h d'incubation (El Baroty *et al.* 2011). Dans une autre étude d'El Baroty *et al.*, il a été montré que l'extrait lipidique brut de la même espèce d'algue présente une cytotoxicité sur HepG2 après 48 h d'incubation avec une CI_{50} de 2,95 $\mu\text{g/mL}$ (El Baroty and Abd El Baky 2014). De même, El Baz *et al.* ont démontré l'activité cytotoxique des sulfolipides de *L. papillosa* collectée également en Mer Rouge sur les cellules MCF-7 et HepG2 avec une CI_{50} de 0,67 et 2,21 $\mu\text{g/mL}$ respectivement après 48 h de traitement (El Baz *et al.* 2013).

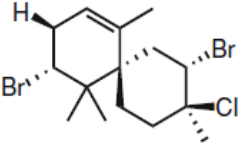
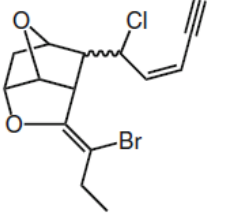
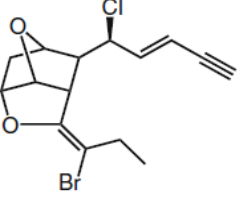
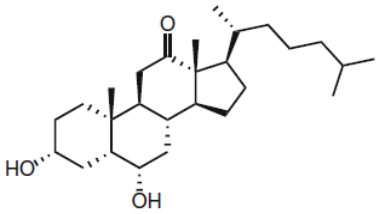
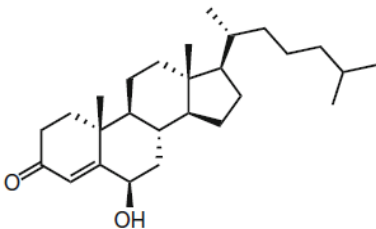
L'étude de Montalvão *et al.* a montré que l'extrait éthanolique de *L. papillosa* collectée de la Mer Égée, présente un effet cytotoxique sélectif sur les cellules cancéreuses de la prostate (LNCa et PC-3) et du sein (MCF-7), mais pas sur la lignée cellulaire épithéliale non tumorigène (MCF-10) (Montalvão *et al.* 2016). Il a également été démontré que les deux extraits eau/éthanol (50 :50) et chloroforme/éthanol (50 :50) de *L. papillosa* collectée de la côte libanaise, présentent une activité cytotoxique sur les cellules leucémiques humaines Jurkat, avec une CI_{50} de 122 et 58 $\mu\text{g/mL}$, respectivement (Tannoury *et al.* 2017).

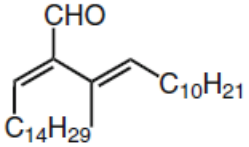
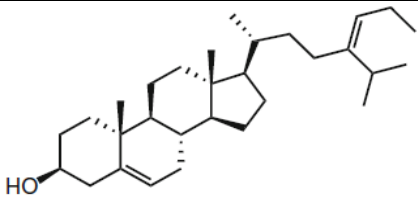
Il convient de noter que deux composés aromatiques ont été isolés de *L. papillosa* collectée de la côte de l'île des Caraïbes : le 4-hydroxy-benzaldehyde et le 4-methoxy-benzyl alcool (Tableau 2) (Wright *et al.* 1996). Ils ont été testés pour leur potentiel cytotoxique sur la lignée cellulaire de cancer KB, mais aucune activité n'a été observée. De même, un amide d'acide gras, le papillamide (Tableau 2), isolé de *L. papillosa* du Japon n'a pas montré d'effet cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses de souris P388 (leucémie) et B16 (mélanome) après 96 h d'incubation ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (Maru *et al.* 2010).

Le tableau ci-après résume les différents métabolites secondaires produits par *L. papillosa* et leur bioactivité (Tableau 2) ; nous noterons que certains composés caractérisés ne présentent pas d'activité biologique remarquable. À ce jour, 12 métabolites ont été isolés et identifiés chez *L. papillosa* de différentes classes chimiques : dérivés terpéniques (stéroïdes et sesquiterpène), C15 acétogénines, composés aromatiques, aldéhydes et amide d'acide gras. Nous notons également que la majorité de ces métabolites ont été isolés à partir d'espèces d'algues collectées de la mer Rouge. Comme nous l'avons remarqué, aucun métabolite secondaire de *L. papillosa* ayant une activité cytotoxique n'a été découvert à ce jour.

Tableau 2. Les métabolites secondaires isolés de *Laurencia papillosa* et leurs activités biologiques associées

Site de collecte de l'algue	Composé	Classe chimique	Structure	Masse moléculaire	Activité biologique	Référence
Japon	(E)-2-tridecyl-2-heptadecanal	Aldéhyde α , β -insaturé		434,4481 [M] ⁺	Aucune activité n'a été testée	(Suzuki, Kurosawa, and Kurata 1987)
Mer des Caraïbes	4-hydroxy benzaldehyde	Composé aromatique		122,123 [M] ⁺	- Activité antipaludique - Activité cytotoxique testée mais composé inactif	(Wright <i>et al.</i> 1996)
	4-methoxy-benzyl alcool	Composé aromatique		138,0669 [M] ⁺	Activités antipaludique et cytotoxique testées mais composé inactif	
Mer rouge	3 β ,7 β -dihydroxy-5 α -cholestan-11-one	Stéroïde		418 [M] ⁺	Aucune activité n'a été testée	(Al-lihaibi <i>et al.</i> 2010)
Japon	Papillamide	Amide d'acide gras		356,2177 [M + Na] ⁺	Activité cytotoxique testée mais composé inactif	(Maru <i>et al.</i> 2010)

Mer Rouge	2,10-dibromo-3-chloro- α -chamigrene	Sesquiterpène		398,607 [M] ⁺	Aucune activité n'a été testée	(Abou-Elnaga, Alarif, and Al-lihaibi 2011)
	(Z)-Maneonene E	C15 acétogénine		342,0012 [M] ⁺	Activité insecticide testée mais composé inactif	
	(E)-Maneonene B	C15 acétogénine		343,647 [M] ⁺	Aucune activité n'a été testée	
Mer Rouge	3 α ,6 α -dihydroxy-5 β -cholestan-12-one	Stéroïde		441,3357 [M + Na] ⁺	Activé antifongique	(Alarif <i>et al.</i> 2011)
	6 β -hydroxy-cholest-4-en-3-one	Stéroïde		400,643 [M] ⁺	Aucune activité n'a été testée	

	(E)-2-((E)-tridec-2-en-2-yl)heptadec-2-enal	Aldéhyde α , β -insaturé		432,4319 [M] ⁺	Activé antifongique	
Inde	24-propylidene cholest-5-en-3-ol	Stéroïde		449,37 [M + Na] ⁺	Activité antimicrobienne	(Kavita, Singh, and Jha 2014)

Bien que les espèces de *Laurencia* soient reconnues comme l'une des sources les plus riches en métabolites secondaires, elles sont également une source de macromolécules, principalement des polysaccharides. Les parois cellulaires des macroalgues marines rouges se caractérisent par leur richesse en polysaccharides sulfatés, notamment les carraghénanes. En fait, quelques études ont évalué l'effet cytotoxique de polysaccharides extraits de *L. papillosa* sur les cellules cancéreuses et leur mécanisme d'action (induction de l'apoptose, arrêt du cycle cellulaire).

Murad *et al.* ont extrait le ι-carraghénane sulfaté de *L. papillosa* collectée dans les eaux côtières syriennes et en ont examiné les effets sur les cellules cancéreuses du sein humain MDA-MB-231 (Murad *et al.* 2015). Les résultats montrent que ce polysaccharide réduit la viabilité cellulaire de manière temps- et dose-dépendante avec une CI_{50} de 50 μM . Il induit également l'apoptose cellulaire. Dans une autre étude de Murad *et al.*, le carraghénane induisait l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231 (Murad *et al.* 2016).

De même, Jazzara *et al.* ont montré que le λ-carraghénane extrait de *L. papillosa* diminue la viabilité des cellules MDA-MB-231 avec une CI_{50} de 25 μM et induit l'apoptose (Jazzara *et al.* 2016).

Récemment, Ghannam *et al.* ont isolé trois sortes de carraghénanes (kappa κ, iota ι et lambda λ) de *L. papillosa* collectée dans les eaux côtières syriennes (Ghannam *et al.* 2018). Les trois polysaccharides ont inhibé la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF-7 de manière dépendante de la dose (25-1000 μM) et du temps (24, 48 et 72 h). De plus, les carraghénanes iota (25 et 50 μM) et lambda (12,5 et 25 μM) ont induit l'apoptose cellulaire après 24 h de traitement.

Dans l'ensemble, il est évident que *Laurencia papillosa* possède divers composés, mais dont très peu ont été étudiés pour leur potentiel cytotoxique.

Points clés

- *Le milieu marin est une source riche d'un point de vue biologique et chimique. De nombreux nouveaux métabolites dotés de propriétés cytotoxiques ont été identifiés chez les organismes marins, en particulier les macroalgues.*
- *Le genre *Laurencia* a été l'un des genres les plus étudiés en raison de sa grande chimiodiversité. Un grand nombre de métabolites isolés d'espèces de *Laurencia* ont été évalués pour leur activité cytotoxique, mais très peu en ce qui concerne *L. papillosa*.*

5. Les lipides des macroalgues marines

Ces dernières années, la composition lipidique des macroalgues marines a attiré l'attention des chercheurs, notamment en raison de leur teneur élevée en acides gras polyinsaturés considérés comme des composants nutritionnels essentiels chez l'Homme et jouant un rôle important dans la prévention des maladies cardiovasculaires et du cancer.

5.1. Les lipides : généralités

Les lipides constituent un groupe hétérogène de composés organiques naturels définis par leur insolubilité dans l'eau et leur solubilité dans les solvants organiques non polaires ou faiblement polaires tels que le chloroforme, l'éther et l'acétone (Harwood *et al.* 2016). La classification des lipides est un sujet complexe. Ces molécules hydrophobes ou amphipathiques sont communément divisées en deux grands groupes selon leur polarité (Kim and Lee 2015) :

- Les lipides non polaires ou neutres (acylglycérols, stérols) qui sont connus principalement pour leur rôle dans le stockage de l'énergie (Khotimchenko 2006).
- Les lipides polaires (glycérophospholipides, glycéroglycolipides) qui sont des composants structuraux des membranes cellulaires (Khotimchenko 2006 ; Guihéneuf, Schmid, and Stengel 2015).

Les lipides sont essentiels pour les organismes vivants, y compris les algues marines (Khotimchenko 2006). Ils assurent des rôles variés :

- rôle structural : ils sont des constituants majeurs des membranes cellulaires, contribuant ainsi à l'architecture membranaire,
- rôle énergétique : ils constituent une forme de réserve d'énergie importante pour l'organisme,
- rôle biologique : ils sont impliqués dans la signalisation cellulaire (Bou Khalil *et al.* 2010).

5.2. Les lipides d'algues marines

Les macroalgues marines contiennent de faibles quantités de lipides n'excédant pas 6% de la matière sèche (Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016). Il a été rapporté que la teneur en lipides des macroalgues est inférieure à celle des autres organismes marins (Holdt and Kraan 2011).

Dans l'extrait lipidique d'algues marines, nous trouvons principalement trois classes de lipides : les lipides neutres, les glycolipides et les phospholipides, qui diffèrent par leur structure, leur polarité et leur fonction (Khotimchenko and Kulikova 1999). Des études ont montré qu'en général les phospholipides sont la principale classe de lipides dans les algues marines (Holdt and Kraan 2011) alors

que d'autres études suggèrent que les glycolipides sont la classe de lipides la plus abondante, suivie des lipides neutres et des phospholipides (Khotimchenko 2002, 2003 ; Holdt and Kraan 2011 ; Pérez, Falqué, and Domínguez 2016).

L'extraction par solvant est la technique courante d'extraction des lipides des algues. Selon la méthode de Bligh et Dyer, les lipides sont souvent extraits des algues avec du chloroforme et du méthanol (Bligh and Dyer 1959). Habituellement, la procédure utilisée ensuite pour séparer les différentes classes de lipides implique une chromatographie sur colonne ouverte de silice (Kates 1990). Ainsi, les lipides neutres seront élués de la colonne d'abord avec du chloroforme, suivi par des glycolipides avec de l'acétone et enfin des phospholipides avec du méthanol. Ensuite, l'identification structurale peut être effectuée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier les composés organiques volatils (de faible poids moléculaire), y compris les acides gras et les stérols présents dans la fraction des lipides neutres (De Vos *et al.* 2007).

5.3. Composition lipidique d'algues

5.3.1. Les lipides neutres

Les lipides neutres comprennent les glycérolipides et les stérols.

Les glycérolipides ou acylglycérols ou glycérides sont des esters d'acides gras et de glycérol, les plus connus étant les mono-, di- et tri-acylglycérols (Bou Khalil *et al.* 2010), dans lesquels 1, 2 ou 3 des groupes hydroxyle (–OH) du glycérol sont estérifiés par des acides gras (Figure 26) (Harwood *et al.* 2016). Les triacylglycérols (TAG) sont les principaux composants des lipides neutres chez les algues (Khotimchenko and Kulikova 1999 ; Khotimchenko 2006), ils constituent une réserve importante d'énergie (Pérez, Falqué, and Domínguez 2016 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016). Leur teneur varie entre 1 et 97% (Kumari *et al.* 2013 ; Pérez, Falqué, and Domínguez 2016). Les monoacylglycérols et les diacylglycérols peuvent également être trouvés mais en petites quantités (Gunstone 1996).

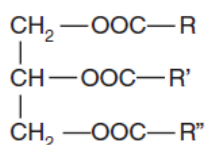


Figure 26. Structure générale du triacylglycérol
(R, R' et R'' sont des chaînes carbonées d'acides gras)

Les stérols possèdent un noyau de stérane dont le carbone 3 porte un groupe hydroxyle (Figure 27). Ils sont des constituants lipidiques des membranes cellulaires, qui régulent la fluidité et la perméabilité membranaire (Kumari *et al.* 2013 ; Harwood *et al.* 2016 ; Pérez, Falqué, and Domínguez 2016). Ils agissent également en tant que précurseurs des vitamines (vitamine D) et des hormones stéroïdes (cortisol, testostérone) liposolubles et servent de messagers secondaires (Holdt and Kraan 2011). Le contenu et le type de stérols varient avec les espèces d'algues. Les principaux stérols des macroalgues sont le cholestérol, le fucostérol et l'isofucostérol. Ces phytostérols ont des effets bénéfiques sur la santé, ils exercent des effets antihypercholestérolémiant, antioxydants, antitumoraux, antidiabétiques, antihypertenseurs et anti-inflammatoires (Kumari *et al.* 2013).

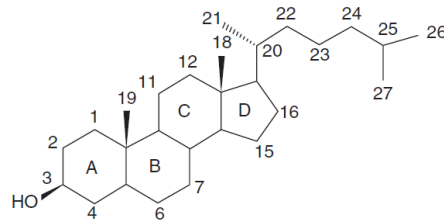


Figure 27. Structure de stérol

5.3.2. Les glycolipides

Les glycolipides contiennent au moins un résidu de sucre lié par une liaison glycosidique à un groupement hydrophobe (Al-Fadhli, Wahidulla, and D'Souza 2006 ; Stengel, Connan, and Popper 2011). Les lipides les plus communs dans la membrane cellulaire sont les glycéroglycolipides. Les acides gras sont reliés à ces groupements, de sorte que le lipide a une tête polaire et une queue non polaire. Nous distinguons deux sous-catégories de glycéroglycolipides : les galactolipides (un galactose attaché à un glycérol) et le sulfolipide (un glycéride avec un groupe fonctionnel contenant du soufre).

Les glycéroglycolipides sont situés dans les membranes photosynthétiques (membranes chloroplastique et thylakoïde). Ils ont un rôle fonctionnel en tant que composants structuraux des membranes (Khotimchenko 2003). En outre, ils servent de marqueurs pour la reconnaissance entre les cellules (Holdt and Kraan 2011).

Les algues marines synthétisent trois principaux glycéroglycolipides : le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) (Figure 28) (Kates 1990 ; Kumari *et al.* 2013 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016). Leur quantité varie selon les espèces, et en outre, ils diffèrent les uns des autres dans leur composition en acides gras (Khotimchenko 2003).

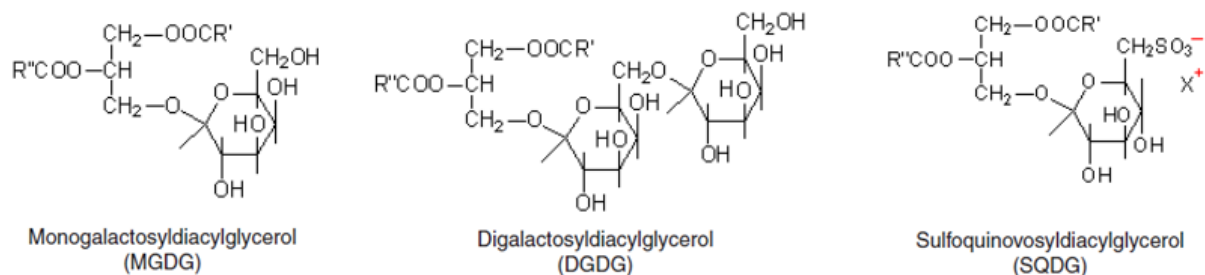


Figure 28. Structure des molécules de glycolipides présentes dans les algues marines

Ces glycolipides (MGDG, DGDG, SQDG) sont d'ailleurs les principaux composants lipidiques des algues (Vaskovsky *et al.* 1996 ; Harwood *et al.* 2016), avec MGDG et DGDG étant les classes dominantes (Sanina, Goncharova, and Kostetsky 2004). Les galactolipides MGDG et DGDG contiennent une ou deux molécules de galactose liées à la position sn-3 du glycérol respectivement, et des acides gras estérifiés aux deux autres positions (Khotimchenko 2002 ; Kumari *et al.* 2013 ; Harwood *et al.* 2016). Ils ne sont pas chargés (Kumari *et al.* 2013). Le SQDG, qui est plus faible en proportion, contient un acide sulfonique sur le carbone 6 d'un résidu de désoxyglucose et est chargé négativement (Kumari *et al.* 2013 ; Harwood *et al.* 2016). Sa structure peut être décrite comme du 1,2-di-O-acyl-3-O-(6-désoxy-6-sulfo- α -D-glucopyranosyl)-sn-glycérol. Il est important pour maintenir la structure et la fonction des membranes (Yunoki *et al.* 2009).

Les glycolipides des algues sont connus pour avoir des effets bénéfiques sur la santé (Melo *et al.* 2015), et diverses activités biologiques telles que les activités antitumorales et anti-inflammatoires (Al-Fadhli, Wahidulla, and D'Souza 2006 ; Yunoki *et al.* 2009).

5.3.3. Les phospholipides

Les glycérophospholipides ou les phosphoglycérides sont des phospholipides constitués de deux acides gras liés à une molécule de glycérol et dont la troisième fonction alcoolique est estérifiée par un groupement phosphate, lui-même lié à un résidu polaire (Figure 29) (Abd El Baky *et al.* 2014). Ces molécules amphiphiles possèdent une tête polaire hydrophile (constituée par le glycérol, le groupe phosphate et le résidu polaire) et deux queues hydrophobes (constituées par les acides gras).

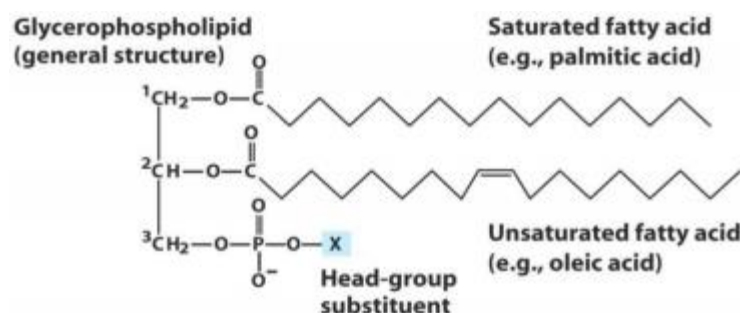


Figure 29. Structure générale des glycérophospholipides

Les phospholipides sont les principaux constituants des membranes cellulaires (Bou Khalil *et al.* 2010 ; Abd El Baky *et al.* 2014). Ils sont essentiels au maintien de la structure des membranes cellulaires et au transport à travers les membranes (Holdt and Kraan 2011 ; Melo *et al.* 2015). Les phospholipides représentent 10 à 20% des lipides totaux dans les algues marines (Kumari *et al.* 2013 ; Pérez, Falqué, and Domínguez 2016). Les principales classes décrites dans les macroalgues sont (Kumari *et al.* 2013) (Figure 30) :

- le phosphatidylglycérol (PG) contenant un autre résidu du glycérol,
- la phosphatidylcholine (PC) contenant de la choline,
- la phosphatidyléthanolamine (PE) contenant de l'éthanolamine,
- la phosphatidylsérine (PS) contenant de la sérine,
- le phosphatidylinositol (PI) contenant du *myo*-inositol,
- l'acide phosphatidique (PA) contenant un autre acide phosphatidique.

Il a été constaté que PG, PE et PC sont les principaux phospholipides dans les algues (Guihéneuf, Schmid, and Stengel 2015). Généralement, les phospholipides sont situés dans les membranes extra-chloroplastiques, à l'exception de PG présent dans la membrane thylakoïde (Kumari *et al.* 2013).

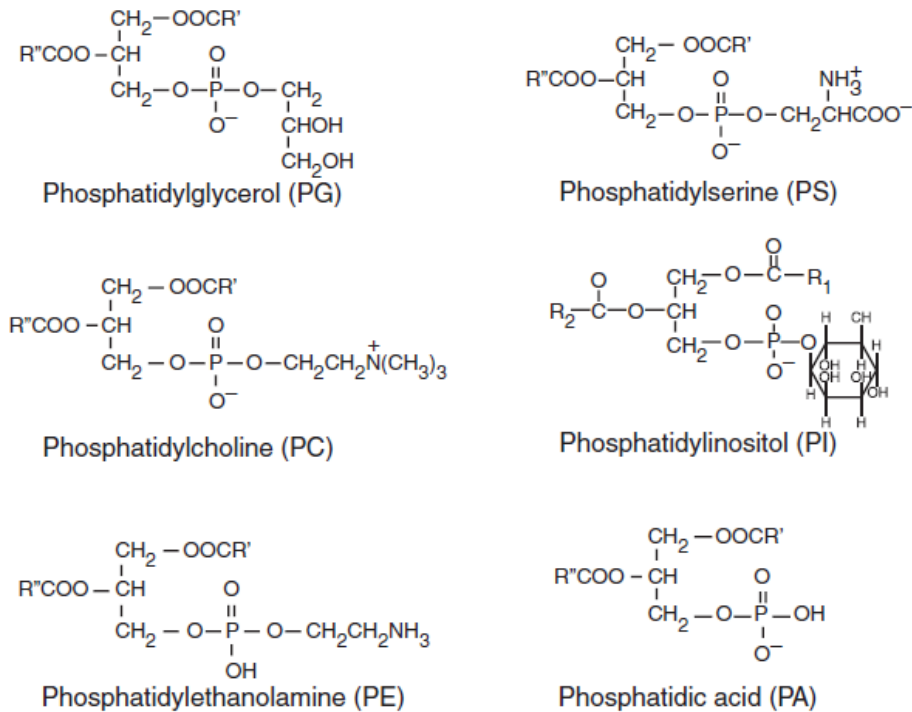


Figure 30. Structure des molécules de phospholipides présentes dans les algues (Kumari et al. 2013)

5.3.4. Les sphingolipides

Les sphingolipides peuvent également être trouvés dans la fraction lipidique polaire des algues marines. Ils contiennent une sphingosine qui est liée à un acide gras par une liaison amide (Figure 31) (Harwood et al. 2016). Ces dérivés de sphingosine comprennent les céramides, phosphosphingolipides (sphingomyélines) et glycosphingolipides (cérébrosides) en fonction de la nature du substituant (hydrogène, phosphocholine et ose, respectivement) ajouté à la fonction alcool primaire de la sphingosine. Ils remplissent plusieurs rôles importants en tant que composants structuraux des membranes et dans la transmission du signal et la reconnaissance des cellules (Bou Khalil et al. 2010).



Figure 31. Structure générale d'un sphingolipide

5.3.5. Les acides gras

L'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) inclut dans les lipides les acides gras (AG) et leurs dérivés. Les AG sont des composants structuraux importants des lipides neutres et polaires

(Khotimchenko 2002, 2005). Par définition, ce sont des acides carboxyliques constitués d'une chaîne hydrocarbonée contenant un groupe carboxyle (-COOH) en tête et un groupe méthyle (-CH₃) à la queue (Tvrzicka *et al.* 2011 ; Calder and Burdge 2012 ; Abdullah and Abdullah 2013). Selon la nomenclature internationale, ils sont notés C_n:_p n-x, où C_n représente le nombre d'atomes de carbone, p le nombre de doubles liaisons et x la position de la première double liaison en comptant à partir de l'extrémité méthyle (n) (Tvrzicka *et al.* 2011). Ils sont structurellement divers, ils se distinguent par le nombre d'atomes de carbone, le nombre et la position des doubles liaisons (Bou Khalil *et al.* 2010). La majorité des acides gras possèdent un nombre pair d'atomes de carbone, mais ceux qui ont une chaîne carbonée impaire peuvent également être présents mais en petites quantités (Kumari *et al.* 2013). Dans les acides gras, nous distinguons trois catégories : acides gras saturés ou AGS (pas de double liaison), monoinsaturés ou AGMI (une double liaison) et polyinsaturés ou AGPI (au moins deux doubles liaisons) (Tvrzicka *et al.* 2011 ; Ambrozova *et al.* 2014). Il existe deux familles importantes d'AGPI, n-3 et n-6, en fonction de la position de la première double liaison située à partir de l'extrémité méthyle (Kumari *et al.* 2013). Les acides gras jouent des rôles différents dans l'organisme, ils sont une source d'énergie, constituants de la membrane, précurseurs de messagers intra et extracellulaires, ... (Calder and Burdge 2012).

Bien que leur teneur en lipides totaux soit faible, les macroalgues marines indifféremment de la classe sont riches en AGPI des séries n-3 et n-6 (Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016) qui sont qualifiés d'essentiels pour l'organisme humain (Khotimchenko 2002 ; Li *et al.* 2002 ; Khotimchenko, Vaskovsky, and Titlyanova 2005), car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'Homme et doivent donc être apportés par l'alimentation (Gressler *et al.* 2010 ; van Ginneken *et al.* 2011 ; Kumari *et al.* 2013 ; Ambrozova *et al.* 2014 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016), notamment l'acide linoléique (LA, C18:2 n-6) et l'acide α -linoléique (ALA, C18:3 n-3) (van Ginneken *et al.* 2011). Dans le corps, ces deux AGPI sont convertis en d'autres AGPI tels que l'acide arachidonique (AA, C20:4 n-6), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n- 3) (van Ginneken *et al.* 2011). L'intérêt pour les lipides algaux est également dû au fait que ces différents AG essentiels agissent comme précurseurs dans la biosynthèse des eicosanoïdes y compris les leucotriènes, les prostaglandines et les thromboxanes (Khotimchenko 2003 ; Pereira *et al.* 2012) qui sont des bio-régulateurs importants dans de nombreux processus cellulaires (Dembitsky and Rozentsvet 1990 ; Khotimchenko 2002 ; Gressler *et al.* 2010 ; Abdullah and Abdullah 2013 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016).

En particulier, les algues contiennent une proportion élevée d'acides gras à longue chaîne n-3 (Ambrozova *et al.* 2014), avec EPA le plus prédominant et présentant des concentrations allant jusqu'à 50% de la teneur en AG totaux (Holdt and Kraan 2011). Les AG n-3 sont essentiels pour la santé humaine en tant que composants structurels des membranes cellulaires puisqu'ils confèrent une perméabilité et des propriétés fonctionnelles des membranes, ils abaissent le taux de lipides sanguins et servent également de précurseurs aux médiateurs et messagers biochimiques (Holdt and Kraan 2011). Beaucoup des AGPI provenant d'algues sont connus pour posséder des activités biologiques (Li *et al.* 2002 ; Khotimchenko, Vaskovsky, and Titlyanova 2005), telles que les activités antioxydantes, antibactériennes, antivirales, cytotoxiques et anti-inflammatoires (Venugopal 2008 ; Pereira *et al.* 2012 ; Abdullah and Abdullah 2013), et pour contribuer à la prévention des maladies cardiovasculaires, du cancer, de l'arthrose et du diabète (Dembitsky and Rozentsvet 1990 ; Tsai and Sun Pan 2012 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016).

La teneur en AGPI n-3 et n-6 varie selon les espèces d'algues étudiées (Rodrigues *et al.* 2015). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (2008), le ratio de n-6/n-3 devrait être inférieur à 10 dans l'alimentation (Pereira *et al.* 2012 ; Rodrigues *et al.* 2015) afin de prévenir les troubles inflammatoires, cardiovasculaires et du système nerveux (van Ginneken *et al.* 2011 ; Abdullah and Abdullah 2013).

Dans la plupart des algues, les AGS et les AGMI, tels que l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0) et l'acide oléique (C18:1 n-9), représentent les principaux constituants des lipides neutres (TAG) (Kumari *et al.* 2013 ; Guihéneuf, Schmid, and Stengel 2015 ; Harwood *et al.* 2016). Les galactolipides (MGDG et DGDG) sont caractérisés par une teneur élevée en AGPI (Khotimchenko 2002 ; Pereira *et al.* 2012 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016), alors que les AGS sont concentrés dans SQDG (Khotimchenko 2002). Les phospholipides sont principalement composés d'AGPI tels que AA, EPA et DHA (Pereira *et al.* 2012 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016).

La teneur en lipides et la composition en acides gras des algues marines varient selon les espèces et les changements saisonniers et géographiques. L'intensité de la lumière, la température, la salinité de l'eau de mer, le pH, la disponibilité des nutriments sont parmi les principaux facteurs environnementaux qui influencent la composition lipidique des algues marines (Tasende 2000 ; Khotimchenko, Vaskovsky, and Titlyanova 2005 ; Kumari *et al.* 2013 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016).

5.4. Les lipides des macroalgues marines rouges

Les macroalgues marines rouges sont intéressantes non seulement comme source de métabolites secondaires et de polysaccharides, mais aussi de par leur teneur élevée en AGPI en C20 (Khotimchenko 2003 ; Kumari *et al.* 2013 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016), principalement EPA et AA qui sont importants pour la santé humaine (Dembitsky and Rozentsvet 1990 ; Tasende 2000 ; Khotimchenko 2005 ; Holdt and Kraan 2011). Et comme déjà indiqué, ces acides sont intéressants parce qu'ils sont des précurseurs dans la biosynthèse des prostaglandines, des thromboxanes et d'autres eicosanoïdes (Khotimchenko 2005).

Dans les algues rouges, l'acide palmitique (C16:0) et l'acide oléique (C18:1 n-9) sont respectivement les AGS et les AGMI les plus abondants (Tasende 2000 ; Khotimchenko, Vaskovsky, and Titlyanova 2005 ; Dawczynski, Schubert, and Jahreis 2007 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016). Ces algues contiennent aussi une proportion élevée d'AGPI comme AA et EPA (Tsai and Sun Pan 2012). Les AGPI C18 sont présents en très petites quantités (Khotimchenko, Vaskovsky, and Titlyanova 2005), ainsi que les C22 et C24 (Trevor *et al.* 1989). A noter que l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) est souvent absent des algues rouges, mais quand il est présent, il est à faible concentration (Abdullah and Abdullah 2013 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016). Les algues rouges ont également été trouvés contenir de petites quantités de sphingolipides tels que les céramides et les cérébrosides (Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016).

La quantité de phospholipides dans les algues rouges varie de 10 à 21% des lipides totaux (Holdt and Kraan 2011). Les prédominants sont particulièrement PC et PG, suivis de PI et PE (Kumari *et al.* 2013 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016), PS n'est pas toujours présente. Les phospholipides des algues rouges sont caractérisés par une forte proportion d'AGPI n-6 sauf le PG qui contient une grande quantité d'AGPI n-3 tel que ALA (Kumari *et al.* 2013). Succinctement, l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque sont parmi les principaux acides gras présents dans la fraction phospholipidique des algues rouges (Kumari *et al.* 2013).

Dans la fraction des glycolipides, les algues rouges ont des niveaux élevés d'AGPI C20 notamment EPA et AA qui sont principalement concentrés dans MGDG (Al-Fadhli, Wahidulla, and D'Souza 2006), le type de galactolipide le plus insaturé dans les algues rouges (Khotimchenko 2002 ; Kumari *et al.* 2013 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016). *A contrario*, SQDG contient l'acide palmitique et l'acide

oléique comme principaux AG (Kumari *et al.* 2013 ; Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016).

Dans la fraction de lipides neutres d'algues rouges, les principaux stérols sont les composés en C27, le cholestérol C27:1 Δ^5 étant le plus commun et répandu (Aknin, Miralles, and Kornprobst 1990 ; Al Easa, Kornprobst, and Rizk 1995 ; Tasende 2000 ; Holdt and Kraan 2011 ; Kumari *et al.* 2013). En plus du cholestérol, deux autres stérols sont présents en quantités importantes, le desmostérol (C27:2 $\Delta^{5,24}$) et le 22-déhydrocholestérol (C27:2 $\Delta^{5,22}$) (Aknin, Miralles, and Kornprobst 1990 ; Tasende 2000 ; Holdt and Kraan 2011). La présence de stérols C26, C28 et C29 en quantités variables a aussi été rapportée chez certaines espèces d'algues rouges (Tasende 2000).

Points clés

- *Les espèces de macroalgues marines ont une teneur totale en lipides inférieure à 6% de la matière sèche, mais elles synthétisent de grandes quantités d'acides gras polyinsaturés.*
- *Trois classes de lipides sont principalement identifiées dans l'extrait lipidique d'algues : les lipides neutres, les glycolipides et les phospholipides.*
- *Des différences dans la composition en acides gras peuvent être trouvées parmi les trois classes de lipides.*
- *Le profil de stérols des algues est très diversifié.*

Chapitre II. Etude de composés cytotoxiques de *Laurencia papillosa*

Préambule

Les macroalgues marines constituent une source importante de composés biologiquement actifs et chimiquement uniques. Des molécules algales classiques sont rapportées dans la littérature pour leur activité cytotoxique et/ou leur rôle dans la prévention du cancer, *in vitro* et/ou *in vivo*. Toutes les classes chimiques sont concernées : polysaccharides des algues brunes (fucoïdanes, laminarines, alginates), des algues vertes (ulvanes) ou des algues rouges (carraghénanes) ; composés phénoliques (phlorotannins) ou dérivés terpéniques (fucoxanthine d'algues brunes) (Déléris, Nazih, and Bard 2016). Des petites molécules de structure plus originale ont également démontré leur potentiel cytotoxique (Smit 2004 ; El Gamal 2010). Néanmoins à ce jour aucune phycomolécule n'est commercialisée comme médicament anticancéreux. Le criblage de molécules algales à activité cytotoxique constitue donc un défi à relever.

Le Liban, situé à l'est de la mer Méditerranée, possède un grand nombre d'organismes marins, mais l'intérêt porté à la valorisation des macroalgues marines est considéré comme récent par rapport à d'autres pays. De plus, les études menées notamment sur les macroalgues rouges de la côte libanaise s'intéressent principalement à la composition en oligo-éléments et acides gras, ainsi qu'à l'isolement et l'évaluation de l'activité biologique des polysaccharides. À la suite de travaux préliminaires effectués au cours de mon Master 2, il a été démontré que les deux extraits bruts eau/éthanol (50 :50, v/v) et chloroforme/éthanol (50 :50, v/v) de la macroalgue marine rouge *Laurencia papillosa* collectée de la côte libanaise présentent une activité cytotoxique sur les cellules leucémiques humaines Jurkat, avec une CI_{50} de 122 et 58 $\mu\text{g/mL}$, respectivement (Tannoury *et al.* 2017). Il semblait donc pertinent de consacrer la suite des travaux sur l'extrait brut chloroforme/éthanol.

Le travail de fractionnement bioguidé a été réalisé en deux temps :

- Un petit lot d'algue collecté en mai 2015 a fait l'objet d'une première étude sur la période mars 2016-décembre 2016. Ces résultats préliminaires ont fait l'objet d'une publication dans « Iranian Journal of Pharmaceutical Research » (soumise le 02/05/2018 ; acceptée le 31/12/2018).
- Cette première étude a validé l'intérêt porté à *L. papillosa* mais elle a montré ses limites quant aux masses de fractions obtenues. Une seconde collecte plus conséquente a donc été entreprise à la même période l'année suivante (mai 2016) et au même site géographique, conduisant à une analyse plus approfondie sur l'intervalle janvier 2017-septembre 2018.

Nous présenterons tout d'abord les techniques communes et les modes opératoires appliqués pour ces deux lots d'algues. Puis nous exposerons les résultats obtenus.

1. Partie expérimentale

Hors exception précisée, les solvants utilisés sont de qualité Normapur, proviennent de SDS et sont distillés avant utilisation. Les proportions des mélanges de solvants sont toujours exprimées volume à volume (v/v). Par convention, cela ne sera plus mentionné par la suite.

1.1. Traitement préalable de la biomasse végétale

L'algue *Laurencia papillosa* a été collectée manuellement de la côte de Barbara au Liban (Figure 32) en mai 2015 pour le premier lot et en mai 2016 pour le second lot (coordonnées GPS de Barbara : 34° 11' 39,56" N 35° 38' 20,901" E - longitude 35,6391393 et latitude 34,1943223). Les algues ont été rincées successivement avec de l'eau du robinet et de l'eau distillée pour éliminer les résidus de sel, le sable et les épiphytes. Elles ont ensuite été congelées à -20°C pour être lyophilisées puis expédiées en France. Elles ont été broyées très finement dans le laboratoire de galénique de la Faculté de Pharmacie de Nantes au moyen d'un concasseur à mâchoires (appareil Erweka modèle AR 400).



Figure 32. Carte montrant le site de collecte de *Laurencia papillosa* de la côte libanaise, voir le numéro 5 (Oksana Belous 2014)

1.2. Extraction solide-liquide

Il est communément admis qu'un mélange de solvants polaire et non polaire permet d'extraire de manière optimale une majorité des composés présents dans un organisme. La méthode de Bligh et Dyer est particulièrement utilisée dans de nombreux laboratoires et emploie à ce titre du chloroforme CHCl_3

et du méthanol MeOH (Bligh and Dyer 1959). La toxicité du CHCl_3 nous a conduit à le remplacer par du dichlorométhane CH_2Cl_2 , qui présente des propriétés extractives similaires mais est moins toxique.

La poudre d'algues lyophilisées (84 g pour le premier lot ; 692 g pour le second lot) a été extraite de manière exhaustive avec un mélange de solvants dichlorométhane/méthanol (50 :50) par macération pendant 1 h à température ambiante et sous agitation mécanique continue. Pour augmenter le rendement, cette opération a été répétée deux fois, la troisième macération étant de 24 h. Le macérât a ensuite été filtré sur papier filtre et concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 40°C. L'extrait obtenu a ensuite été dessalé par partage liquide-liquide (dichlorométhane/eau 65 :35). La phase organique a été collectée et séchée sur sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4). La solution a ensuite été filtrée sur du papier filtre et le filtrat a été concentré à sec. L'extrait sec a été conservé à 4°C à l'obscurité pour des essais biologiques et chimiques ultérieurs.

1.3. Méthodes chromatographiques appliquées au fractionnement bioguidé

1.3.1. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée selon les cas dans un but analytique ou dans un but préparatif.

La technique de CCM analytique a été mise en œuvre afin d'une part de choisir au mieux les phases stationnaire et mobile pendant les différentes étapes de fractionnement, et d'autre part d'objectiver la séparation et la caractérisation des différents composés lors des étapes de purification. Des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice ont été utilisées (épaisseur 0,2 mm, Alugram®Sil G/UV254, Macherey-Nagel). Après dépôt des échantillons et élution dans les phases mobiles adéquates, les plaques ont été observées dans le visible et sous lampe à ultraviolet (UV) à 254 et 365 nm. La présence d'un indicateur de fluorescence dans la phase stationnaire permet la détection à 254 nm des composés insaturés. La fluorescence naturelle de certaines molécules à 365 nm est également une méthode de révélation. Enfin, la révélation a été complétée par pulvérisation de réactifs chimiques appropriés (orcinol ou vanilline sulfurique) suivie d'un chauffage à l'étuve à 110°C.

La CCM préparative a été réalisée sur une plaque en verre 20 x 20 cm recouverte de gel de silice (PK6F, porosité 60Å, épaisseur de couche 500 µm, Whatman) préalablement activée (chauffage à 30°C pendant 1 h avant utilisation). L'échantillon a été déposé manuellement sous forme de bande concentrée et laissé sécher. Ensuite, la plaque a été développée dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90 :10 jusqu'à mi-hauteur puis dans hexane/éther éthylique/acide acétique 50 :50 :1. Par la suite, toutes les bandes ont

été grattées en utilisant une spatule, dissoutes dans du CH₂Cl₂/MeOH 95 :5, filtrées (filtre nylon, diamètre 13 mm, porosité 0,45 µm ; Interchim) et évaporées à sec.

1.3.2. La Chromatographie Liquide sur Colonne ouverte (CLC)

La première étape de fractionnement de l'extrait brut a débuté par une chromatographie liquide sur colonne ouverte (CLC). Une phase stationnaire de silice (silice 60 Å, granulométrie 35-70 µm ; Chromagel SDS) a été utilisée. Un dépôt sec est réalisé en tête de colonne (adsorption de l'extrait brut sur de la silice). Pour éviter toute perturbation du dépôt de l'extrait pendant l'élution, du sable de Fontainebleau a été ajouté en haut de la colonne. La colonne a été éluée d'abord avec du CH₂Cl₂, puis avec de l'acétone et enfin avec du MeOH, le solvant étant remplacé par le suivant lorsqu'il n'entraîne plus de produits (un suivi pondéral est réalisé en cours de fractionnement).

Cette technique a également été appliquée dans la suite de la purification. Un gradient de solvant de polarité croissante CH₂Cl₂/MeOH de 98 :2 à 0 :100 a alors été utilisé.

Toutes les fractions récupérées sont filtrées (filtre nylon, diamètre 13 mm, porosité 0,45 µm ; Interchim) pour éliminer la silice et évaporées à sec.

1.3.3. La chromatographie Liquide sous Vide (CLV)

La chromatographie liquide sous vide (CLV) consiste en un dépôt de l'échantillon sur une phase stationnaire dans une colonne de verre. L'élution des composés est réalisée par un gradient discontinu de solvants de force éluante croissante, avec pour particularité l'assèchement de la colonne entre chaque mélange de solvant grâce à une pompe à vide.

Une phase stationnaire de silice greffée C₁₈ a été utilisée (silice C₁₈ 60 Å, granulométrie 60 µm, Macherey-Nagel). Le dépôt s'est fait sous forme sèche (adsorption de la fraction sur une petite quantité de phase stationnaire) en tête de colonne. L'élution des composés a été assurée par un gradient discontinu de MeOH/H₂O (40 :60 à 95 :5) puis de MeOH/CH₂Cl₂ (90 :10 à 0 :100).

1.3.4. La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Agilent HP 1200 équipée d'un dégazeur, d'une pompe quaternaire à solvants, d'un injecteur automatique (Hewlett Packard 1100 series), d'un détecteur à barrette de diodes (Agilent Technologies 1200 series) et d'un collecteur de fractions. L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel Agilent Chemstation B.03.01.

Les différentes fractions et sous-fractions d'intérêt ont été soumises à une purification par CLHP dans une des conditions suivantes :

- En phase inverse analytique, mode isocratique :
 - Colonne : analytique C₁₈ (longueur 250 mm ; diamètre 4,6 mm ; granulométrie 5 µm).
 - Echantillon : 5 mg/mL dans du MeOH, soit 1 mg/200 µL injecté.
 - Eluant : 100% MeOH pendant 20 min.
 - Débit : 1 mL/min.
 - Détection : Spectres UV-visibles collectés à 210, 230, 254 et 280 nm.

- En phase inverse semi-préparative, mode gradient d'élution :
 - Colonne : semi-préparative C₁₈ (longueur 250 mm ; diamètre 10 mm ; granulométrie 5 µm, porosité 100 Å).
 - Echantillon : 10 mg/mL dans du MeOH, soit 1,5 mg/150 µL injecté.
 - Gradient d'élution : 75% de MeOH pendant 2 min ; gradient linéaire 75-80% de MeOH pendant 13 min ; 80% de MeOH pendant 5 min ; gradient linéaire 80-100% de MeOH pendant 5 min ; 100% de MeOH pendant 15 min ; retour aux conditions initiales en 5 min (Tableau 3).
 - Débit : 1,5 mL/min.
 - Détection : Spectres UV-visibles collectés à 210, 230, 254 et 280 nm.

Tableau 3. Gradient de solvants utilisé en CLHP semi-préparative

Temps (min)	% MeOH	% H ₂ O
0	75	25
2	75	25
15	80	20
20	80	20
25	100	0
40	100	0
45	75	25

- En phase normale analytique, mode gradient d'élution :
 - Colonne : analytique Silice (longueur 250 mm ; diamètre 4,6 mm ; granulométrie 5 µm ; porosité 100 Å).
 - Echantillon : 10 mg/mL dans CH₂Cl₂/MeOH 99,5 :0,5, soit 1 mg/100 µL injecté.

- Gradient d'élution : 99,5% de CH₂Cl₂ pendant 10 min ; gradient linéaire 99,5-80% de CH₂Cl₂ pendant 4 min ; 80% de CH₂Cl₂ pendant 10 min ; gradient linéaire 80-50% de CH₂Cl₂ pendant 6 min ; 50% de CH₂Cl₂ pendant 10 min (Tableau 4).
- Débit : 1 mL/min.
- Détection : Spectres UV-visibles collectés à 210, 230, 254 et 280 nm.

Tableau 4. Gradient de solvants utilisé en CLHP analytique

Temps (min)	% CH ₂ Cl ₂	% MeOH
0	99,5	0,5
10	99,5	0,5
14	80	20
24	80	20
30	50	50
40	50	50

1.4. Méthodes spectroscopiques

1.4.1. UPLC-HRMS-IT-TOF

La spectrométrie de masse à haute résolution permet de déterminer la masse moléculaire du composé et de proposer une ou plusieurs formule(s) brute(s). Dans la présente étude, l'analyse déréplicative a été réalisée par UPLC-HRMS-IT-TOF (Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry Ion Trap Time of Flight, Shimadzu). Cet appareil est composé pour la partie chromatographie liquide de deux pompes LC-20ADXR, d'un passeur d'échantillons automatique SIL-20ACXR, d'un four à colonne CTO-20AC, d'un détecteur UV à barrettes de diodes SPD-M20A, et pour la partie spectromètre de masse d'une source en électrospray (ESI) et d'un analyseur de masse couplant trappe ionique (IT) et temps de vol (TOF). La séparation des composés a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Colonne : Kinetex™ (C₁₈) (100 × 2,1 mm × 2,6 μm, Phenomenex), chauffée à 40°C.
- Echantillon : 0,1 mg/mL de MeOH, soit 0,2 μg/2 μL injecté.
- Phase mobile : Acétonitrile (ACN)/H₂O (acidifiée par 0,1% d'acide formique), 0,3 mL/min.
- Gradient d'élution : 15% pendant 2 min ; gradient linéaire 15-100% d'ACN pendant 23 min ; 100% d'ACN pendant 5 min ; retour aux conditions initiales en 1 min ; 15% d'ACN pendant 4 min.
- Détection : Spectres UV-visibles collectés de 190 à 600 nm.

Les données de spectrométrie de masse ont été analysées en mode ESI positif et négatif dans la gamme de rapports m/z 100-1000.

Les solvants utilisés sont de qualité CLHP et proviennent de chez Baker (acétonitrile, méthanol) ou Biosolve (eau).

1.4.2. Traitement des données

MZmine 2 est le logiciel utilisé dans la présente étude pour le traitement des données de spectrométrie de masse. Les fichiers de données brutes doivent d'abord être exportés au format netCDF pour pouvoir être utilisés avec MZmine 2 (Pluskal *et al.* 2010). La première étape consiste à détecter les ions d'intérêt : elle génère une liste de masses (m/z) pour chaque fichier de données. Seuls les points de données supérieurs au niveau de bruit spécifié à 45 000 ont été pris en compte et détectés sous forme de pics m/z . La deuxième étape permet la création des chromatogrammes pour chaque m/z détecté avec un laps de temps minimal de 0,02 min et une tolérance m/z de 15 ppm. La troisième étape est la déconvolution des chromatogrammes qui permet de séparer les chromatogrammes contenant plusieurs pics en des chromatogrammes ne contenant qu'un seul pic. Les pics sont ensuite désisotopés selon une tolérance m/z de 15 ppm et une tolérance de temps de rétention de 0,1 min. La quatrième étape consiste en un alignement des pics et un gap filling avec une tolérance m/z de 15 ppm et une tolérance de temps de rétention de 0,1 min. Ensuite, la liste des pics est filtrée. Les pics du blanc (MeOH), les pics ayant m/z récurrent et les pics avant 1 min et après 30 min sont éliminés de la matrice générée. Par la suite, il y a l'étape d'identification consistant à rechercher les adduits et les pics complexes.

1.5. Tests biologiques

1.5.1. Lignée cellulaire et condition de culture

La lignée cellulaire du cancer du sein humain MCF-7 est la plus utilisée dans notre laboratoire de recherche (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Royaume-Uni). Les cellules MCF-7 sont cultivées dans le milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) additionné de 10% de sérum de veau fœtal, 1% de glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine. Elles sont incubées à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

1.5.2. Test de cytotoxicité MTT

Le test de MTT (Sigma Aldrich) a été utilisé pour étudier l'effet des échantillons algaux sur la croissance des cellules cancéreuses. Les cellules MCF-7 ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (10 000 cellules par puits). Après 24 h d'incubation, les cellules ont été traitées à différentes concentrations. Pour chaque concentration, quatre puits ont été réalisés. Les différentes plaques ont ensuite été laissées à incuber pendant 24, 48 et 72 h à 37°C. En bref, après le temps d'incubation voulu, 100 µL de milieu de chaque puits sont prélevés et 50 µL de la solution de MTT (2,5 mg/mL) sont ensuite ajoutés à chaque puits. Les plaques sont laissées à incuber pendant 4 h supplémentaires à 37°C. Ensuite, le milieu de culture a été retiré et 200 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma Aldrich) ont été ajouté dans chacun des puits pour solubiliser les cristaux violets de formazan. L'absorbance dans chaque puits a été mesurée à une longueur d'onde de 570 nm par un lecteur de microplaque SpectraMax 190. La CI_{50} (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance cellulaire) a été déterminée graphiquement à partir d'une courbe montrant l'inhibition cellulaire en pourcentage en fonction du logarithme de la concentration testée (logiciel Excel 2016).

1.5.3. Test annexine V/ iodure de propidium

Le test annexine V/IP a été réalisé pour la détection de l'apoptose. 500 000 cellules par puits ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits et traitées avec les fractions algales pendant 24 h. Ensuite, après décollement par la trypsine, les cellules ont été recueillies et lavées avec du PBS (tampon phosphate salin) et mises en suspension avec un tampon de liaison à l'annexine 1X. Elles ont ensuite été soumises à un test Annexine-FITC (isothiocyanate de fluorescéine) en utilisant un kit d'apoptose Annexine V-FITC et IP (Life Technologies, Saint-Aubin, France) conformément aux instructions du fabricant. Les cellules ont été marquées à l'annexine V (50 µg/mL) et à l'IP (100 µg/mL) et analysées par cytométrie en flux (BD Accuri™ C6). L'analyse des cellules marquées peut distinguer les cellules en quatre groupes, à savoir les cellules vivantes (annexine V⁻ IP⁻), les cellules apoptotiques en phase précoce (annexine V⁺ IP⁻), les cellules apoptotiques en phase tardive (annexine V⁺ IP⁺) et les cellules nécrotiques (annexine V⁻ IP⁺).

1.5.4. RT-qPCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Les cellules MCF-7 ont étéensemencées à une densité de 500 000 cellules par puits dans une plaque à 6 puits et incubées pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été mises en contact avec les fractions d'algues pendant 24 h. Tout d'abord, l'ARN total a été extrait par le réactif TriZol (Invitrogen, Cergy-Pontoise,

France) conformément aux instructions du fabricant. L'ADN complémentaire a ensuite été synthétisé à partir de l'ARNm (1 µg/µL) en utilisant iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Une étape d'amorçage de 5 min à 25°C a été suivie d'une réaction de transcription inverse de 30 min à 42°C, puis d'une inactivation de la transcription inverse de 5 min à 85°C. Puis, la PCR quantitative a été réalisée sur un système de détection de MyiQ2 Real time PCR, en utilisant le SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Elle a été effectuée pour 45 cycles de 95°C pendant 30 secondes et de 60°C pendant 30 secondes. Les niveaux de transcrits des gènes impliqués dans l'apoptose (Bax, Bcl-2 et caspase-3) et du gène de référence (18S) ont été déterminés. La quantification relative a été effectuée en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$, avec $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ gène de référence} - \Delta CT \text{ gène d'intérêt}$.

1.5.5. Western blot

Les cellules MCF-7 ont étéensemencées à une densité de 500 000 cellules par puits dans une plaque à 6 puits. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été traitées avec les fractions d'algues pendant 24 h. Les extraits de protéines ont été lysés avec un tampon de lyse protéique composé de M-PER (réactif d'extraction de protéines de mammifères) et d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Life Technologies). Ensuite, la concentration en protéines a été déterminée selon la méthode BCA (Bicinchoninic acid Assay). Après séparation en SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide de dodécylsulfate de sodium), les protéines (20 µg) ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Ensuite, la membrane a été bloquée avec 5% de lait écrémé à température ambiante pendant 2 h, puis incubée pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires contre Bcl-2, cytochrome c et beta-actine qui est utilisée comme un contrôle de chargement (Sigma Aldrich). Après lavage, la membrane a été incubée avec des anticorps secondaires (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Allemagne). Enfin, les bandes ont été visualisées et quantifiées à l'aide du système Odyssey.

2. Résultats

2.1. Analyse du premier lot

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans « Iranian Journal of Pharmaceutical Research » (soumise le 02/05/2018 ; acceptée le 31/12/2018).

2.1.1. Présentation de la publication

Acetone Fraction of the Red Marine Alga *Laurencia papillosa* Reduces the Expression of Bcl-2 Anti-apoptotic Marker and Flotillin-2 Lipid Raft Marker in MCF-7 Breast Cancer Cells

Josiane Elia^a, Karina Petit^{a*}, Jean-Michel Huvelin^a, Mona Tannoury^b, Mona Diab-Assaf^c, Delphine Carbonnelle^a and Hassan Nazih^a

^aFaculty of Pharmacy, EA 2160 MMS - «Institut Universitaire Mer et Littoral», FR3473 CNRS, University of Nantes, Nantes, France. ^bDepartment of Biology, Faculty of Sciences II, Lebanese University, Fanar, Lebanon. ^cDepartment of Biochemistry and Chemistry, Faculty of Sciences II, Lebanese University, Fanar, Lebanon

*Corresponding author: E-mail: karina.petit@univ-nantes.fr

Abstract

Marine macroalgae have attracted much attention in recent years as a valuable source of bioactive metabolites. The cytotoxic potential of the *Laurencia papillosa* red alga collected from the Lebanese coast has been investigated on human breast cancer cells MCF-7. The crude extract of *L. papillosa* was fractionated by column chromatography using a series of increasingly polar solvents (methylene chloride, acetone and methanol). Cytotoxicity of the crude extract and fractions was determined by MTT assay in MCF-7 cells. Apoptosis was detected by annexin V/ propidium iodide assay and by measurement of Bcl-2 expression. Flotillin-2 expression was examined using RT-qPCR and Western blot. The crude extract, and the fractions of CH₂Cl₂ and acetone exhibited a dose-dependent cytotoxic effect on MCF-7 cells. Apoptosis was specifically induced by one of the acetone fractions having the highest cytotoxicity. It has been demonstrated by an increase in late phase apoptotic cell populations, and a decrease in Bcl-2 anti-apoptotic marker expression on mRNA and protein levels in a dose- and time-dependent manner. Furthermore, this active fraction decreased Flotillin-2 expression associated with cancer progression. Our data suggest that *L. papillosa* is an important source of cytotoxic metabolites. Further studies are needed for the chemical characterization of the metabolite associated with observed biological activities.

Keywords: *Laurencia papillosa*; MCF-7 cells; cytotoxic activity; apoptosis; Flotillin-2.

Introduction

Breast cancer is the second most common cancer in women worldwide with about 1.67 million new cancer cases diagnosed in 2012 and the fifth leading cause of cancer death with about 522 000 deaths (1). However, most of the drugs currently used to treat cancer have serious side effects on normal cells, hence the need to develop new effective anticancer agents.

In this context, great attention has been paid to natural products obtained from plants, micro-organisms and marine organisms as a source of anticancer agents. An exhaustive review pointed out that of all new anticancer drugs approved worldwide during the period 1940-2014, 65% were of natural origin and 19% of synthetic origin (2). The different categories of natural origin are either an unaltered natural product, a derivative of a natural product resulting from a semi-synthetic modification, or a product made by total synthesis but the pharmacophore originates from the natural product. Among the drugs from natural sources in clinical use are some examples: vinblastine and paclitaxel derived from plants, actinomycin D and bleomycin A2 derived from microorganisms, cytarabine and trabectedin of marine origin (3), (4).

Covering 70% of the earth's surface, the oceans represent the largest reservoir of bioactive compounds and are therefore a remarkable resource for the discovery of new pharmaceutical drugs (5). Several anticancer compounds of marine origin have already been approved or are in clinical trials (6), (7).

Marine macroalgae are one of the natural resources of the marine environment that have long been used as a source of functional foods and in traditional medicines (8). The literature has established that marine algae represent a rich source of natural products with unique biological activity and original chemical structure that may be useful in the search for effective and specific drugs for the treatment of human diseases (9)-(11). In the field of cancer, the potential of marine algae as a source of anticancer drugs has been mainly studied using crude extracts or partially purified fractions (12).

In particular, red macroalgae have been found to be among the main producers of secondary metabolites in the marine environment, the genus *Laurencia* being the most prolific (13). This genus belongs to the Ceramiales order and the Rhodomelaceae family and comprises 146 taxonomically accepted species distributed throughout the world, mainly in tropical and subtropical waters (14). Although *Laurencia* has been widely studied over the past fifty years, many new metabolites are still being reported until today (5), (15), (16). These metabolites belong to the chemical classes of sesquiterpenes, C15 acetogenins, diterpenes, triterpenes, indoles, steroids, aromatic compounds, and

miscellaneous metabolites, most being halogenated (13). Many of these metabolites have been reported to possess various biological activities, such as cytotoxic, antibacterial, antifungal, antiviral, anti-parasitic, and anti-inflammatory activities.

Lebanon has a large number of marine organisms, but interest in the valorization of marine macroalgae is considered recent compared to other countries. *Laurencia papillosa* (C. Agardh) is widely distributed on the Lebanese rocky coast. In fact, several studies have been conducted on this species collected all over the world (Japan, Red Sea, Caribbean Sea, India), and many metabolites have been isolated, identified and tested for their biological activity (17)-(23). Recently, it has been reported that both crude extracts of ethanol/water (50/50, v/v) and ethanol/chloroform (50/50, v/v) of *L. papillosa* collected from the Lebanese coast exhibited moderate cytotoxic activity against Jurkat human cancer cell line (acute T-cell leukemia) with an IC₅₀ of 121.6 and 57.7 µg/mL respectively (24).

This prompted us to conduct further studies on the cytotoxic activity of *Laurencia papillosa* collected from the Lebanese coast on the human breast cancer cell line MCF-7, followed by apoptosis assays.

Experimental

Algal material

Alga sample was collected from Barbara coast in Lebanon, May 2015. Identification was carried out by Dr. Tannoury according to Guiry and Guiry (25). An herbarium voucher specimen No. 700 was deposited in the Herbarium of the Department of Biology, Faculty of Science II, Lebanese University (24). Fresh material was washed successively with tap water and distilled water to remove salt, sand and epiphytes, and then lyophilized and ground very finely.

Extraction and fractionation

Lyophilized alga (84 g) was macerated thrice by methylene chloride/methanol (CH₂Cl₂/MeOH 50/50, v/v) at room temperature (26), (27). The combined extracts were concentrated under reduced pressure at 40°C using a rotary evaporator. Crude extract (2 g) was then partitioned between methylene chloride and distilled water (73/27, v/v) for desalting. Organic layer was concentrated to dryness to yield the CH₂Cl₂/MeOH extract (239.5 mg). A small amount (19.8 mg) was then subjected to silica gel column chromatography with successive elution of solvents of increasing polarity (methylene chloride, acetone and methanol) (28).

Biological and chemical materials

MCF-7 human breast cancer cells were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, United Kingdom). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT), Dimethyl sulfoxide (DMSO), primers for qPCR, and rabbit antibody against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH), Bcl-2, and human Flotillin-2 (FLOT2) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Annexin V/propidium iodide (PI) kit, M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent, and Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail were purchased from Life Technologies (Saint-Aubin, France). TRIzol reagent for RNA isolation was from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR and iQ™ SYBR Green Supermix were purchased from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). IRDye whole IgG secondary antibodies were from LI-COR Biosciences (Bad Homburg, Germany).

Cell culture and treatment

MCF-7 cancer cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine and 1% penicillin-streptomycin at 37°C under a controlled atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity. Cells were cultured for 24 h in quadruplicate in 96-well plates (10⁴ cells per well; MTT assay) or in 6-well plates (5 x 10⁵ cells per well; Annexin V-FITC/PI assay, RT-qPCR and Western blot), and then treated with various concentrations of the algal samples which were first dissolved in DMSO at 0.2% and then diluted in DMEM containing 0.1% bovine serum albumin. DMSO at 0.2% was tested as a negative control. Subsequently, cells were incubated for 24, 48 or 72 h at 37°C.

MTT cytotoxicity assay

As described by Carbonnelle *et al.* (29), after the desired incubation time, 50 µL of MTT solution (2.5 mg/mL) were added to each well and incubated for a further 4 h at 37°C. Thereafter, culture medium was removed and 200 µL DMSO were added to each well to solubilize the formazan crystals. A SpectraMax 190 microplate reader was used to measure the absorbance at 570 nm. Samples with an IC₅₀ less than 30 µg/mL were regarded as active and could be considered for further investigation.

Annexin V-FITC/ propidium iodide assay

Cells were trypsinized, washed with phosphate-buffered saline, suspended with 1X annexin binding buffer, incubated with Annexin V and PI staining solution for 15 min at room temperature in the dark, and finally analyzed using the Accuri C6 flow cytometer (30).

RNA extraction and RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted by the TriZol Reagent. The mRNA (1 µg/µL) was then reverse-transcribed into complementary DNA using iScript Reverse Transcription Supermix. A priming step for 5 min at 25°C was followed by a reverse transcription phase of 30 min at 42°C, then a reverse transcription inactivation of 5 min at 85°C. Quantitative PCR was then performed on a MyiQ Real Time PCR Detection System, using the SYBR Green Supermix. PCR was carried out for 45 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 30 s (30). Transcript levels of Bcl-2, FLOT2 and the reference gene 18S were determined. The relative quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, with $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ reference gene} - \Delta CT \text{ gene of interest}$. The primer sequences are shown in Table I.

Western blot analysis

Protein extracts were prepared by cell lysis with a buffer composed of M-PER, protease and phosphatase inhibitors, and sodium chloride. Protein concentration was then determined according to the bicinchoninic acid assay using a bovine serum albumin standard. After separating by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, proteins (20 µg) were transferred to a nitrocellulose membrane which was then blocked with 5% skim milk at room temperature for 2 h and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against Bcl-2, FLOT2 and GAPDH (a loading control). The membrane was then washed and incubated with secondary antibodies at room temperature. Finally, proteins bands were visualized and quantified using the Odyssey system (29).

Data analysis

The values represent the mean \pm standard deviation of three different experiments. Student's t-test was used and p-value <0.05 (*) was considered significantly different from control, p <0.01 (**) moderately significant and p <0.001 (***) highly significant. The IC₅₀ indicating the concentration of the algal sample inhibiting 50% of the cell growth was estimated graphically using the Excel 2007 software.

Results

Growth inhibition of MCF-7 cells by Laurencia papillosa crude extract and fractions

The CH₂Cl₂/MeOH extract exerted a cytotoxic effect in a dose-dependent manner and presented an IC₅₀ of 11.8 µg/mL after 72 h of treatment (Figure 1A). Silica gel column chromatography led to 24 fractions of increasing polarity: F1 to F8 with CH₂Cl₂, F9 to F16 with acetone and F17 to F24 with MeOH. IC₅₀ was calculated after 72 h of treatment for each solvent. Despite a modest cytotoxic activity of the acetone fraction (IC₅₀ of 17.3 µg/mL; Figure 1C) compared to that of CH₂Cl₂ fraction (IC₅₀ of 0.4 µg/mL; Figure 1B), the dose-response curves were more consistent with the potential future therapeutic use of the acetone fraction. Based on our criteria, the MeOH fraction was inactive (IC₅₀ > 100 µg/mL; Figure 1D). The cytotoxic activity on the MCF-7 cells of each acetone fractions was then evaluated at 10 and 50 µg/mL for 24 and 48 h. F10 to F16 were inactive, the IC₅₀ was greater than 50 µg/mL after 48 h of incubation (data not shown). The comprehensive investigation thus highlighted the F9 acetone fraction as the most cytotoxic. Inhibitory activity was dose- and time-dependent with an IC₅₀ of 16.3 µg/mL after 48 h of treatment (Figure 2). The most active fraction (F9 acetone fraction) was then selected for further investigation.

Apoptosis induction in MCF-7 cells by the F9 acetone fraction

Apoptosis was first measured by flow cytometry after double staining with Annexin V-FITC and PI. F9 acetone fraction increased the percentage of late apoptotic cells in a dose- and time-dependent manner (Figure 3A), from 1.1% (CTRL) to 1.6% (10 µg/mL) and 4.5% (50 µg/mL) after 24 h, and from 1% (CTRL) to 1.3% (10 µg/mL) and 3.9% (50 µg/mL) after 48 h (Figure 3B). In addition, a marked increase of necrotic cells was observed after 24 and 48 h of exposure to 50 µg/mL from 1.3% (CTRL) to 33.9% and from 0.4% (CTRL) to 29.7%, respectively (Figure 3C). The expression profile of the anti-apoptotic marker Bcl-2 was then evaluated with RT-qPCR and Western blot. The mRNA expression of Bcl-2 in MCF-7 cells was noticeably decreased in a dose- and time-dependent manner after incubation with the F9 acetone fraction. As shown in Figure 4A, mRNA expression of Bcl-2 decreased with increasing concentration of the algal fraction from 0.9 to 0.2 and from 0.5 to 0.4 compared to the control defined as 1 after 24 and 48 h of incubation, respectively. Similarly, the expression level of Bcl-2 decreased in a dose- and time-dependent manner (Figure 4B). The bands were quantified and expressed as a percentage of the control group, concluding a marked decrease at 50 µg/mL of F9 acetone fraction from 83.3% at 24 h to 46.5% at 48 h (data not shown).

Flotillin-2 expression reduction in MCF-7 cells by the F9 acetone fraction

FLOT2 is a lipid raft marker which promotes the progression of several types of cancer. FLOT2 mRNA expression decreased in a dose- dependent manner from 0.92 (10 µg/mL) to 0.37 (50 µg/mL) and from 1.01 (10 µg/mL) to 0.59 (50 µg/mL) relative to the control after 24 and 48 h of treatment respectively (Figure 5A). Western blot pointed out that FLOT2 protein expression was reduced in F9 acetone fraction-treated MCF-7 cells, as evidenced by the decreased intensity of the targeting protein bands after 48 h of treatment with 50 µg/mL (Figure 5B).

Discussion

Many publications have highlighted the potential implications of natural products of marine macroalgae that exhibit cytotoxic activity (10), (12). In this study, we have reported for the first time the cytotoxic activity of the CH₂Cl₂/MeOH (50/50, v/v) extract of the species *L. papillosa* collected from the Lebanese coast. To date, numerous studies have been conducted on the cytotoxic potential of various *L. papillosa* extracts on several human cancer cell lines. Especially the acetone extract of the Brazilian alga *L. papillosa* which showed a moderate cytotoxic activity on several cancer cell lines, including HL-60 (leukemia), B-16 (murine melanoma), HCT-8 (human colon carcinoma), MCF-7 (human breast carcinoma) and CEM (leukemia) cancer cell lines with an IC₅₀ of 9.9, 13.9, 15.6, 31.6 and 49.0 µg/mL, respectively (31). In another study, no cytotoxic activity on the three breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7 and T-47D) was detected for the ethanol extract of *L. papillosa* collected from the Iranian coast of the Persian Gulf after 72 h of incubation (32). However, the ethanol extract of *L. papillosa* from the Aegean Sea in Turkey inhibited the growth of the prostate (LNCa, PC-3) and breast (MCF-7) cancer cells at 50 µg/mL, but not of the non-tumorigenic epithelial cells (MCF-10A) (33).

Our results are consistent with those of Torres *et al.* (31) but diverge from other studies (32), (33). Variations in the cytotoxic effect of the same algal species can be explained by the choice of extraction solvent and its ability to recover bioactive compounds, as well as by seasonal and geographical fluctuations due to changes in environmental factors such as temperature, light and salinity (13), (34). Regarding literature of *Laurencia*, several extraction solvents were used. A mixture of CH₂Cl₂/MeOH seems to be relevant, as it is the most frequent used and it demonstrated ability to extract a wide range of molecules. On the whole, algae collection (geography and season), extraction and treatment conditions were optimal since our *L. papillosa* extract was active compared to previous studies.

Likewise, some metabolites such as aromatic compounds and fatty acid amide have been isolated from *L. papillosa* species and their cytotoxic potential against several cancer cell lines has been previously studied. The results showed that the aromatic compounds, 4-hydroxy-benzaldehyde and 4-methoxy-benzyl alcohol, were inactive against KB cancer cells (18), as well as the fatty acid amide, papillamide, which did not show any cytotoxic activity against P-388 (mouse leukemia) and B-16 (mouse melanoma) cancer cells after 96 h of incubation (IC_{50} greater than 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (20). However, most compounds isolated from *L. papillosa* have not been tested for cytotoxic activity on MCF-7 human breast cancer cells. Many other reports relate the cytotoxic activity of compounds isolated from the genus *Laurencia* against MCF-7 cells. For example, caespitol isolated from the Brazilian *L. catarinensis* and teuhetenone A from the Red Sea *L. obtusa* are both sesquiterpenes with high cytotoxic activity against MCF-7 cells (IC_{50} of 9.7 and 22.8 μM respectively) (26), (35).

Besides, UPLC-HRMS-IT-TOF (Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry Ion Trap Time of Flight) analyses were performed (data not shown). Dereplication suggested the absence of already known cytotoxic metabolites in the F9 acetone fraction.

A bio-guided fractionation led to the isolation of 24 fractions. Among them, the F9 acetone fraction exhibited an important cytotoxic activity on MCF-7 cells. The cell growth inhibition can be explained by the triggering of the apoptosis process. The induction of apoptotic cell death by the F9 acetone fraction was therefore studied. The percentage of late-apoptotic cells increased while the expression of the anti-apoptotic marker Bcl-2 decreased on mRNA and protein levels. In general, apoptosis allows the normal development of the organism and the maintenance of cellular homeostasis resulting from a balance between proliferation and cell death, and any deregulation leads to cancer development and progression. Its induction causes various morphological, molecular and biochemical changes such as chromatin condensation, DNA fragmentation, activation or inactivation of members of the Bcl-2 family, activation of the caspases, release of the cytochrome c in the cytoplasm, exposure of phosphatidylserine to the extracellular membrane, which can be estimated using various assays (36). Our findings are in agreement with other studies showing the pro-apoptotic effect of various metabolites of algae of the genus *Laurencia*, here are some examples. B16F1 melanoma cells treated with laurinterol, a halogenated sesquiterpene isolated from *L. okamurai*, exhibited DNA fragmentation, cell shrinkage, chromatin compaction, nuclear blebbing, and apoptotic bodies (37). In addition, the percentage of cells in the sub-G1 phase, the activities of different caspases, the transcriptional activity of p53, and the expression level of phospho-p53 were increased. Overall, these results indicated that laurinterol induces

apoptosis via p53 activation. According to Campos *et al.* (38), elatol which is a sesquiterpene isolated from *L. microcladia*, was able to induce cell cycle arrest in the G1 and sub-G1 phases in B16F10 murine melanoma cells leading the cells to apoptosis. The results of various biological tests demonstrated that elatol increased the number of apoptotic cells as well as the expression of the pro-apoptotic proteins p53, Bak and caspase-9, and decreased the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL.

There are numerous cellular signal transduction pathways controlling the processes associated with tumor progression, such as the regulation of cell proliferation and apoptosis that occur in lipid rafts (39). These lipid rafts are defined as micro-domains within the plasma membrane enriched in cholesterol and glycosphingolipids. They serve as signaling platforms in particular for growth factor receptors such as the epidermal growth factor receptor (40). FLOT2 isolated from these micro-domains is used as a lipid raft marker protein. Its increased expression has been observed in cancer cells relative to normal cells, suggesting its involvement in the development and progression of various cancers including breast cancer. In addition, it has been reported that its down-regulation is associated with inhibition of cancer cell proliferation, migration and invasion (41), (42). FLOT2 is therefore a useful biomarker and a good pharmacological target in oncology. The present study is the first to investigate the FLOT2 expression level in MCF-7 cells treated with an algal fraction. Quantitative PCR and Western blot analyses performed in this study showed a decrease in lipid raft marker expression, thus demonstrating the importance of membrane rafts as a target for cancer treatment.

Conclusion

The present study demonstrated the cytotoxic activity of CH₂Cl₂/MeOH (50/50, v/v) extract of *L. papillosa* on human breast cancer cells MCF-7. Biological evaluations have highlighted the great interest of the F9 acetone fraction: cell growth inhibition, apoptosis induction by increasing the percentage of late apoptotic cells and decreasing the expression of the anti-apoptotic member Bcl-2. Moreover, a decrease in the expression of FLOT2, which is generally over-expressed in cancer cells, has been observed. Preliminary dereplication studies did not identify already known compounds. Further studies are therefore needed for the chemical characterization of the metabolite associated with observed biological activities, suggesting that the red alga *L. papillosa* collected from the Lebanese coast could be a potential source of cytotoxic metabolites.

Acknowledgements

This investigation was supported by the Islamic Center Association for Guidance and Higher Education, Lebanon.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

References

- (1) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* (2015) 136: E359-86.
- (2) Newman DJ and Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* (2016) 79: 629-61.
- (3) Colegate SM and Molyneux RJ. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination, Second Edition. CRC Press (2007).
- (4) Newman DJ and Cragg GM. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current 'State of Play'. *Planta Med.* (2016) 82: 775–89.
- (5) Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG and Prinsep MR. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* (2017) 34: 235–94.
- (6) Petit K and Biard J-F. Marine natural products and related compounds as anticancer agents: an overview of their clinical status. *Anticancer Agents Med. Chem.* (2013) 13: 603–31.
- (7) Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J. Pharm. Bioallied Sci.* (2016) 8: 83–91.
- (8) Kim S-K and Pangestuti R. Potential role of marine algae on female health, beauty, and longevity. *Adv. Food Nutr. Res.* (2011) 64: 41–55.
- (9) Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today* (2003) 8: 536–44.
- (10) Smit A.J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.* (2004) 16: 245–62.
- (11) Barbosa M, Valentão P and Andrade PB. Bioactive Compounds from Macroalgae in the New Millennium: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Mar. Drugs* (2014) 12: 4934–72.

- (12) Murphy C, Hotchkiss S, Worthington J and McKeown S. The potential of seaweed as a source of drugs for use in cancer chemotherapy. *J. Appl. Phycol.* (2014) 26: 2211–64.
- (13) Harizani M, Ioannou E and Roussis V. The Laurencia Paradox: An Endless Source of Chemodiversity. In: Kinghorn D, Falk H, Gibbons S and Kobayashi J. (eds.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer, Switzerland (2016) 91–252.
- (14) Cabrita MT, Vale C and Rauter AP. Halogenated Compounds from Marine Algae. *Mar. Drugs* (2010) 8: 2301–17.
- (15) Kamada T and Vairappan CS. Non-halogenated new sesquiterpenes from Bornean *Laurencia snackeyi*. *Nat. Prod. Res.* (2017) 31: 333–40.
- (16) Kamada T, Phan C-S and Vairappan CS. New anti-bacterial halogenated tricyclic sesquiterpenes from Bornean *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas. *Nat. Prod. Res.* (2017) 1–8.
- (17) Suzuki M, Kurosawa E and Kurata K. (E)-2-Tridecyl-2-heptadecenal, an Unusual Metabolite from the Red Alga *Laurencia* Species. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1987) 60: 3793–94.
- (18) Wright AD, König GM, Angerhofer CK, Greenidge P, Linden A and Desqueyroux-Faúndez R. Antimalarial Activity: The Search for Marine-Derived Natural Products with Selective Antimalarial Activity. *J. Nat. Prod.* (1996) 59: 710–16.
- (19) Al-lihaibi SS, Ayyad S-EN, Al-wessaby E and Alarif WM. 3b, 7b-Dihydroxy-5a-cholestan-11-one: A new oxidation pattern of cholestane skeleton from *Laurencia papillosa*. *Biochem. Syst. Ecol.* (2010) 38: 861–63.
- (20) Maru N, Ohno O, Koyama T, Yamada K and Uemura D. Papillamide, a Novel Fatty Acid Amide from the Red Alga *Laurencia papillosa*. *Chem. Lett.* (2010) 39: 366–67.
- (21) Abou-Elnaga ZS, Alarif WM and Al-lihaibi S. New Larvicidal Acetogenin from the Red Alga *Laurencia papillosa*. *CLEAN – Soil Air Water* (2011) 39: 787–94.
- (22) Alarif WM, Al-Lihaibi SS, Abdel-Lateff A and Ayyad S-EN. New antifungal cholestane and aldehyde derivatives from the red alga *Laurencia papillosa*. *Nat. Prod. Commun.* (2011) 6: 1821–24.
- (23) Kavita K, Singh VK and Jha B. 24-Branched Δ^5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Microbiol. Res.* (2014) 169: 301–06.
- (24) Tannoury M, Saab A, Elia J, Harb NN, Makhoul H and Diab M. *In Vitro* Cytotoxic Activity of *Laurencia papillosa*, Marine Red Algae from the Lebanese Coast. *J Appl Pharm Sci.* (2017) 7: 175–79.
- (25) Guiry MD and Guiry GM. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [cited 2018 Jul 25]. Available from: URL: <http://www.algaebase.org>.

- (26) Lhullier C, Falkenberg M, Ioannou E, Quesada A, Papazafiri P, Horta PA, Schenkel EP, Vagias C and Roussis V. Cytotoxic Halogenated Metabolites from the Brazilian Red Alga *Laurencia catarinensis*. *J. Nat. Prod.* (2010) 73: 27–32.
- (27) Cragg GM, Newman DJ and Yang SS. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. *J. Nat. Prod.* (2006) 69: 488–98.
- (28) Barnathan G, Miralles J, Njinkoue J-M, Mangoni A, Fattorusso E, Debitus C, Boury-Esnault N and Kornprobst J-M. Sterol composition of three marine sponge species from the genus *Cinachyrella*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* (1992) 103: 1043–47.
- (29) Carbonnelle D, Luu TH, Chaillou C, Huvelin J-M, Bard J-M and Nazih H. LXR Activation Down-regulates Lipid Raft Markers FLOT2 and DHHC5 in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* (2017) 37: 4067–73.
- (30) Luu TH, Bard J-M, Carbonnelle D, Chaillou C, Huvelin J-M, Bobin-Dubigeon C and Nazih H. Lithocholic bile acid inhibits lipogenesis and induces apoptosis in breast cancer cells. *Cell. Oncol.* (2018) 41: 13–24.
- (31) Torres MR, Sousa APA, Filho EATS, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO and Lotufo LVC. Biological activity of aqueous and organic extracts of seaweeds from Ceará State, Brazil. *Arq. Ciênc. Mar.* (2005) 38: 55–63.
- (32) Erfani N, Nazemosadat Z and Moein M. Cytotoxic activity of ten algae from the Persian Gulf and Oman Sea on human breast cancer cell lines; MDA-MB-231, MCF-7, and T-47D. *Pharmacogn. Res.* (2015) 7: 133–37.
- (33) Montalvão S, Demirel Z, Devi P, Lombardi V, Hongisto V, Perälä M, Hattara J, Imamoglu E, Tilvi SS, Turan G, Dalay MC and Tammela P. Large-scale bioprospecting of cyanobacteria, micro- and macroalgae from the Aegean Sea. *New Biotechnol.* (2016) 33: 399–406.
- (34) Alzeer J, Vummidi B, Arafah R, Rimawi W, Saleem H and Luedtke N. The influence of extraction solvents on the anticancer activities of Palestinian medicinal plants. *J. Med. Plants Res.* (2014) 8: 408–15.
- (35) Alarif W, Al-Footy K, Zubair MS, Halid M, Ghandourah M, Basaif S, Al-Lihaibi S, Ayyad SE and Badria F. The role of new eudesmane-type sesquiterpenoid and known eudesmane derivatives from the red alga *Laurencia obtusa* as potential antifungal-antitumour agents. *Nat. Prod. Res.* (2016) 30: 1150–55.
- (36) Oancea M, Mazumder S, Crosby ME and Almasan A. Apoptosis assays. *Methods Mol. Med.* (2006) 129: 279–90.
- (37) Kim MM, Mendis E and Kim SK. *Laurencia okamurai* Extract Containing Laurinterol Induces Apoptosis in Melanoma Cells. *J. Med. Food.* (2008) 11: 260–66.

- (38) Campos A, Souza CB, Lhullier C, Falkenberg M, Schenkel EP, Ribeiro-do-Valle RM and Siqueira JM. Anti-tumour effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae *Laurencia microcladia*. *J. Pharm. Pharmacol.* (2012) 64: 1146–54.
- (39) Hryniewicz-Jankowska A, Augoff K, Biernatowska A, Podkalicka J and Sikorski AF. Membrane rafts as a novel target in cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* (2014) 1845: 155–65.
- (40) Guéguinou M, Gambade A, Félix R, Chantôme A, Fourbon Y, Bougnoux P, Weber G, Potier-Cartereau M and Vandier C. Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca²⁺ channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochim. Biophys. Acta.* (2015) 1848: 2603–20.
- (41) Wang X, Yang Q, Guo L, Li XH, Zhao XH, Song LB and Lin HX. Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival outcomes. *J. Transl. Med.* (2013) 11: 190.
- (42) Banning A, Kurrle N, Meister M and Tikkanen R. Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Cancer. *Cells.* (2014) 3: 129–49.

Table 1. Primers used for RT-qPCR analysis of gene expression

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
18S	GATGCGGCGGCGTTATTCC	CTCCTGGTGGTGCCCTTCC
Bcl-2	GATTGTGGCCTTCTTTGAG	GTTCCACAAAGGCATCC
Flottilin-2	CAAGATTGCTGACTCTAAGC	GCACAACCTCAATCTCAATC

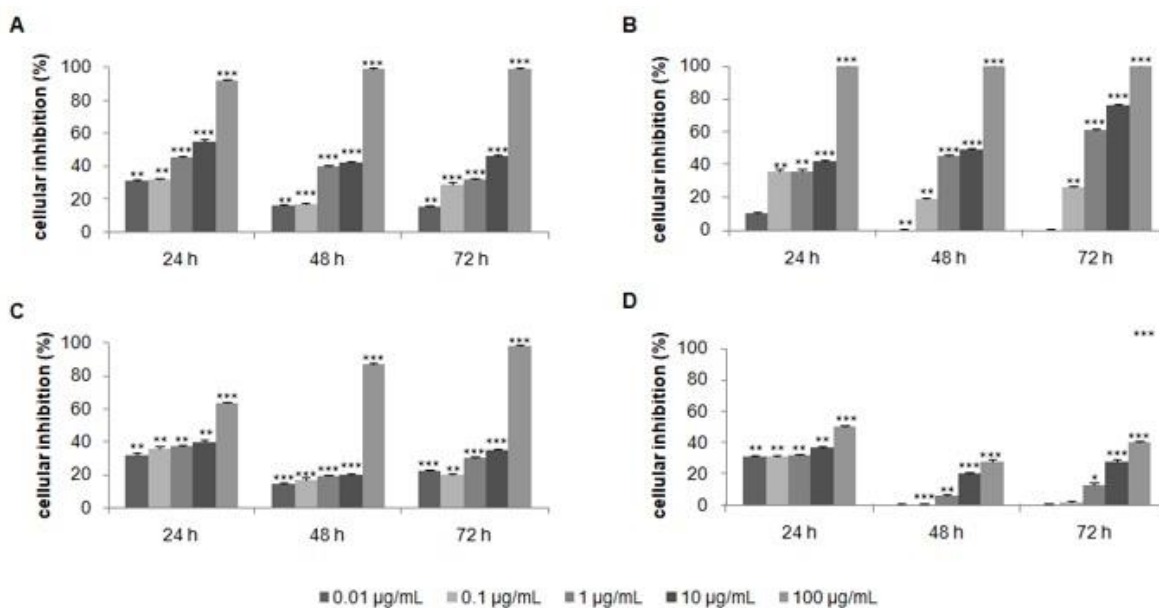


Figure 1. Effect of the crude extract of *Laurencia papillosa* and its fractions on the growth of MCF-7 cells. Cells were cultured for 24 h and treated with the indicated concentrations for 24, 48 and 72 h. Cytotoxicity was determined by MTT assay. (A) CH₂Cl₂/MeOH extract, (B) CH₂Cl₂ fractions, (C) acetone fractions, (D) MeOH fractions.

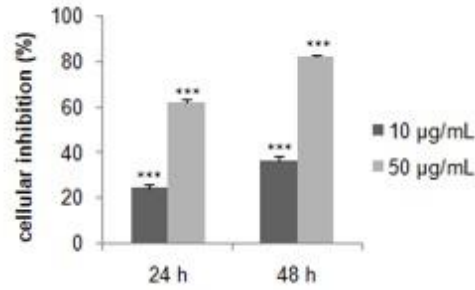


Figure 2. Effect of F9 acetone fraction on the growth of MCF-7 cells. Cells were treated with the indicated concentration for 24 and 48 h. Cytotoxicity was evaluated by MTT assay.

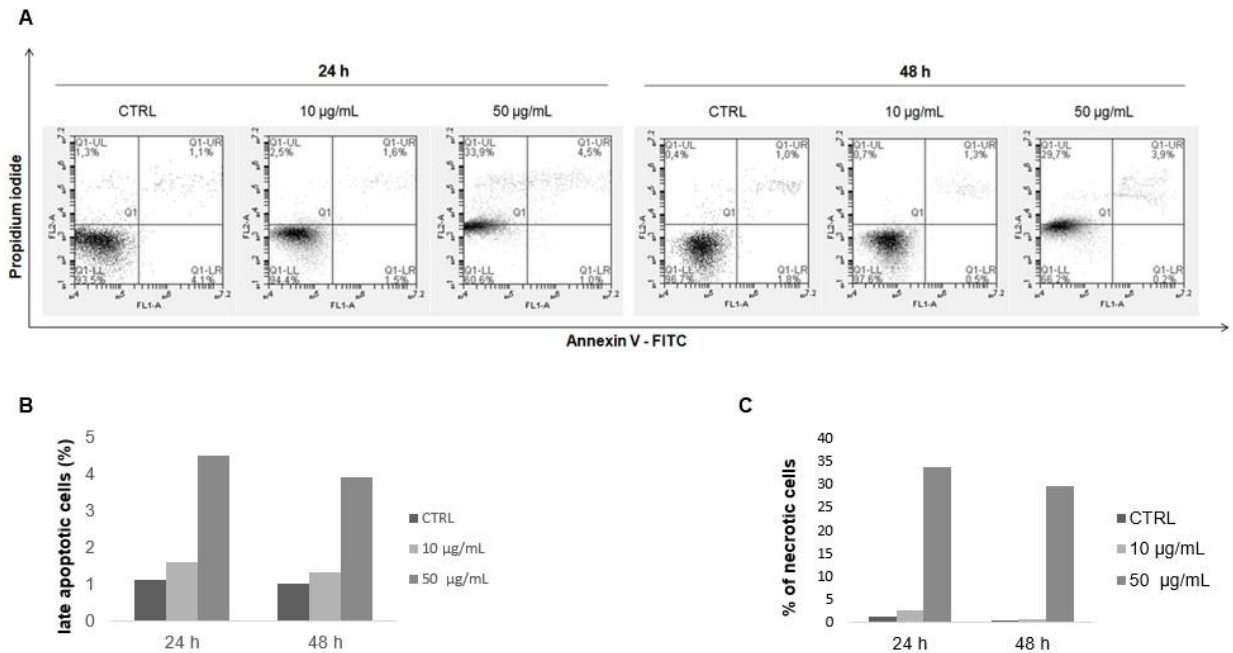


Figure 3. Annexin V-FITC/ PI double staining analysis of apoptosis in MCF-7 cells. Cells were treated with the F9 acetone fraction at 10 and 50 µg/mL for 24 and 48 h, and then stained with annexin V-FITC/PI and analyzed by flow cytometry. (A) Representative flow cytometry results of apoptosis: lower left quadrant, annexin V⁻/PI⁻, living cells; lower right quadrant, annexin V⁺/PI⁻, early apoptotic cells; upper right quadrant, annexin V⁺/PI⁺, late apoptotic cells; upper left quadrant, annexin V⁻/PI⁺, necrotic cells. Quantification of the percentage of late apoptotic (B) and necrotic (C) cells compared to the control group.

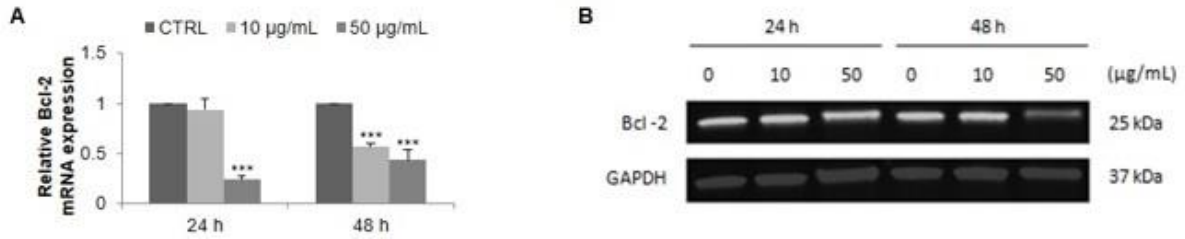


Figure 4. Effect of F9 acetone fraction on apoptosis in MCF-7 cells after 24 and 48 h of treatment at 10 and 50 µg/mL. (A) RT-qPCR analysis of Bcl-2 mRNA expression, the mRNA expression was normalized to 18S and the results are expressed relative to the control set at 1. (B) Western blot analysis of Bcl-2 protein level, GAPDH is used as a control.

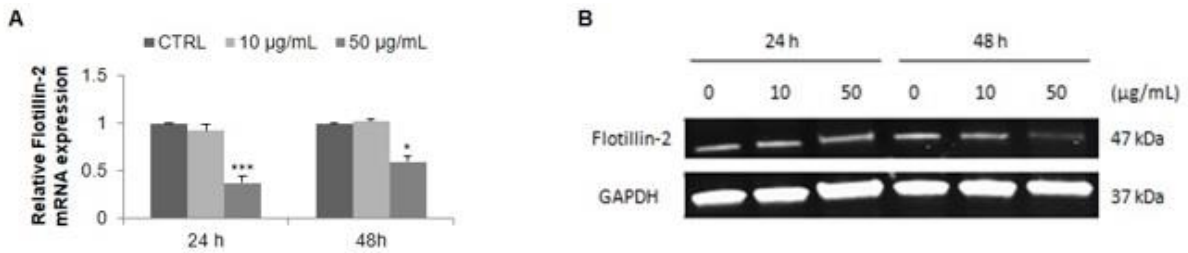


Figure 5. Effect of F9 acetone fraction on Flotillin-2 expression in untreated MCF-7 cells (CTRL) and in MCF-7 cells treated at 10 and 50 µg/mL for 24 and 48 h. (A) RT-qPCR analysis, the results were normalized relative to 18S ribosomal RNA level, expressed relative to untreated cells defined as 1.00. (B) Western blot representative, GAPDH was used as a control for protein loading.

2.1.2. Conclusion

Un fractionnement bioguidé à petite échelle de *L. papillosa* collectée de la côte libanaise a été réalisé au cours de cette thèse et nous a permis de retenir la fraction acétonique F9, présentant une activité cytotoxique sur MCF-7, comme la plus prometteuse.

L'un des signes distinctifs du cancer est la capacité des cellules malignes à échapper à l'apoptose (Pfeffer and Singh 2018). Dans les cellules cancéreuses, la voie apoptotique est généralement inhibée par une expression réduite de protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak) et une surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2). Le ciblage de la voie apoptotique constitue donc une cible potentielle pour le traitement du cancer. Ainsi, nous avons étudié l'effet de la fraction acétonique F9 sur l'expression de Bcl-2 dans les cellules de cancer du sein MCF-7. Une diminution de l'expression de ce marqueur anti-apoptotique a été observée, indiquant que la fraction acétonique F9 peut réduire la croissance des cellules cancéreuses via la régulation négative de Bcl-2, provoquant ainsi une apoptose.

Des études antérieures ont montré que la flotilline-2, un marqueur des radeaux lipidiques, est impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses du sein en inhibant la signalisation EGFR et MAPK (Liu *et al.* 2018). Cela nous a incité à étudier l'effet de la fraction acétonique F9 sur l'expression de la flotilline-2. Le traitement des cellules MCF-7 avec la fraction acétonique F9 a diminué l'expression de la flotilline-2, ce qui suggère une perturbation des radeaux lipidiques et donc des voies de signalisation associées à la tumorigenèse.

Ces résultats intéressants nous ont incités à rechercher les composés responsables des activités biologiques observées. Ainsi, une analyse déréplicative de la fraction acétonique F9 par UPLC-HRMS-IT-TOF a ensuite été réalisée (données présentées à l'annexe 2). À partir du chromatogramme, les pics ont été extraits et analysés par MZmine 2. Une seule correspondance a été mise en évidence : le produit élué au temps de rétention de 21,06 min a été identifié par la base de données comme étant le stéroïde cholest-4-èn-3-one ($m/z = 385,3487 = [M + H]^+; C_{27}H_{44}O$), mais il sera impossible de poursuivre la purification pour l'isoler en raison de la faible quantité de la fraction acétonique F9. Il est à noter que ce stéroïde a été obtenu auparavant à partir de l'extrait d'éther de pétrole de l'algue rouge *Laurencia obtusa* (Alarif *et al.* 2012), mais aucune activité cytotoxique n'y était associée. Les mécanismes d'action du cholest-4-èn-3-one dans les cellules cancéreuses du sein seront présentés au chapitre IV.

2.2. Analyse du second lot

2.2.1. Obtention de l'extrait brut

Le second lot (692 g d'algues lyophilisées) a été extrait comme précédemment. Après dessalage, un extrait brut de 5,1 g a été obtenu, soit un taux d'extraction de 0,74% par rapport à la masse d'algues lyophilisées. L'extrait sec a été conservé à 4°C à l'obscurité pour des essais biologiques et chimiques ultérieurs.

2.2.2. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait brut

L'extrait brut de *L. papillosa* a été testé pour son potentiel cytotoxique sur les cellules de cancer du sein humain MCF-7 à diverses concentrations (1, 10 et 100 µg/mL) et à différents temps d'exposition (24, 48 et 72 h) en utilisant le test MTT. L'extrait a présenté une activité cytotoxique sur les cellules MCF-7 avec une CI_{50} de 35,6 µg/mL après 72 h d'incubation.

2.2.3. Fractionnement bioguidé de l'extrait algal

À la lumière de ce résultat et afin d'isoler les composés de l'extrait algal responsables de l'activité cytotoxique, nous avons initié un fractionnement bioguidé. L'extrait brut a été soumis à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice (diamètre de la colonne 3 cm ; 100 g de silice ; hauteur de silice 36 cm). Une élution successive de solvants de polarité croissante a permis d'individualiser 78 fractions notées F1 à F78, d'un volume de 250 mL chacune. Les fractions F1 à F23 sont éluées avec du CH_2Cl_2 , F24 à F58 avec de l'acétone et F59 à F78 avec du MeOH (Figure 33). Le rendement de cette séparation est de 95,8%, ce qui indique que nous avons globalement tout récupéré.

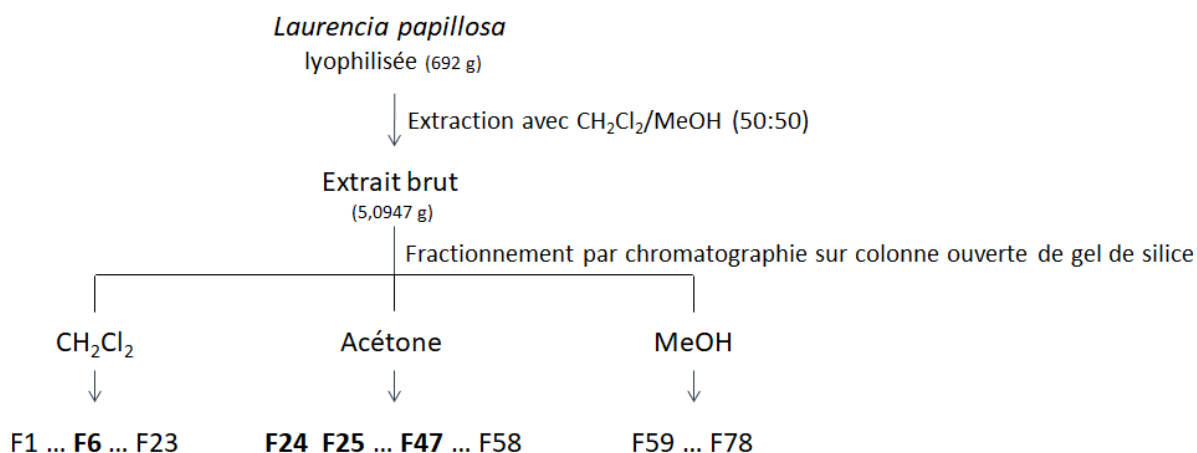


Figure 33. Schéma de fractionnement de l'extrait brut de *Laurencia papillosa*

Les fractions éluées avec du dichlorométhane et de l'acétone ont été analysées par CCM afin de mettre en évidence leur profil chimique. Les fractions chlorométhyléniques ont été analysées en comparaison avec des témoins (stérol, acétate de stérol et triglycérides) (Figure 34). La migration a été faite dans un mélange hexane/éther éthylique/acide acétique (50 :50 :1) et la révélation a été faite par pulvérisation de vanilline sulfurique.

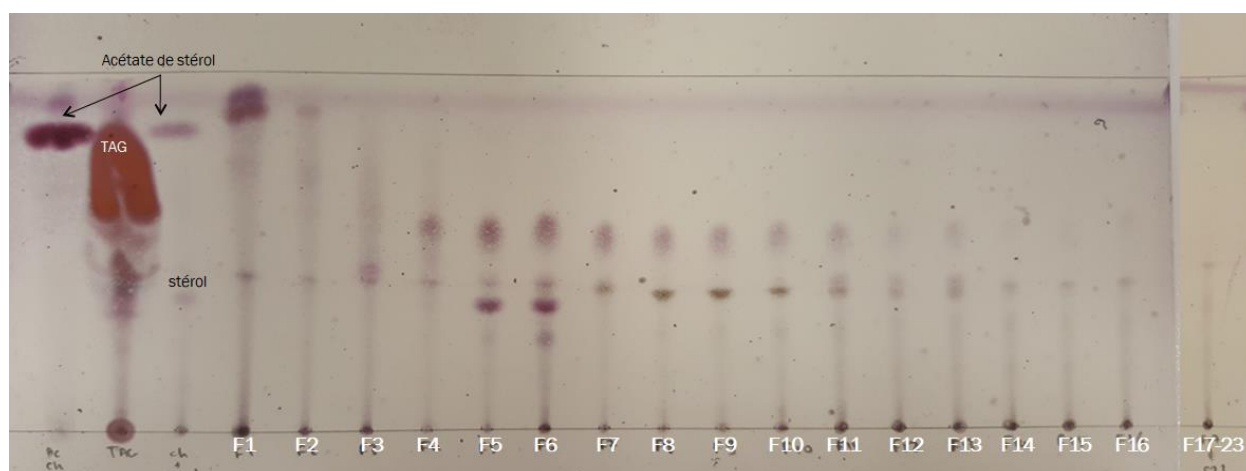


Figure 34. Profil en CCM des fractions F1 à F23 éluées avec du CH_2Cl_2
(phase stationnaire silice ; phase mobile hexane/éther éthylique/acide acétique (50 :50 :1) ;
révélateur vanilline sulfurique)

Les fractions acétoniques ont été comparées aux témoins : un galactocérobroside commercial et un extrait de glycolipides issu des feuilles d'épinard (fabriqué au laboratoire) contenant MGDG, DGDG et SQDG (Figure 35). La phase mobile est constituée d'un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85 :15) et le révélateur est l'orcinol.

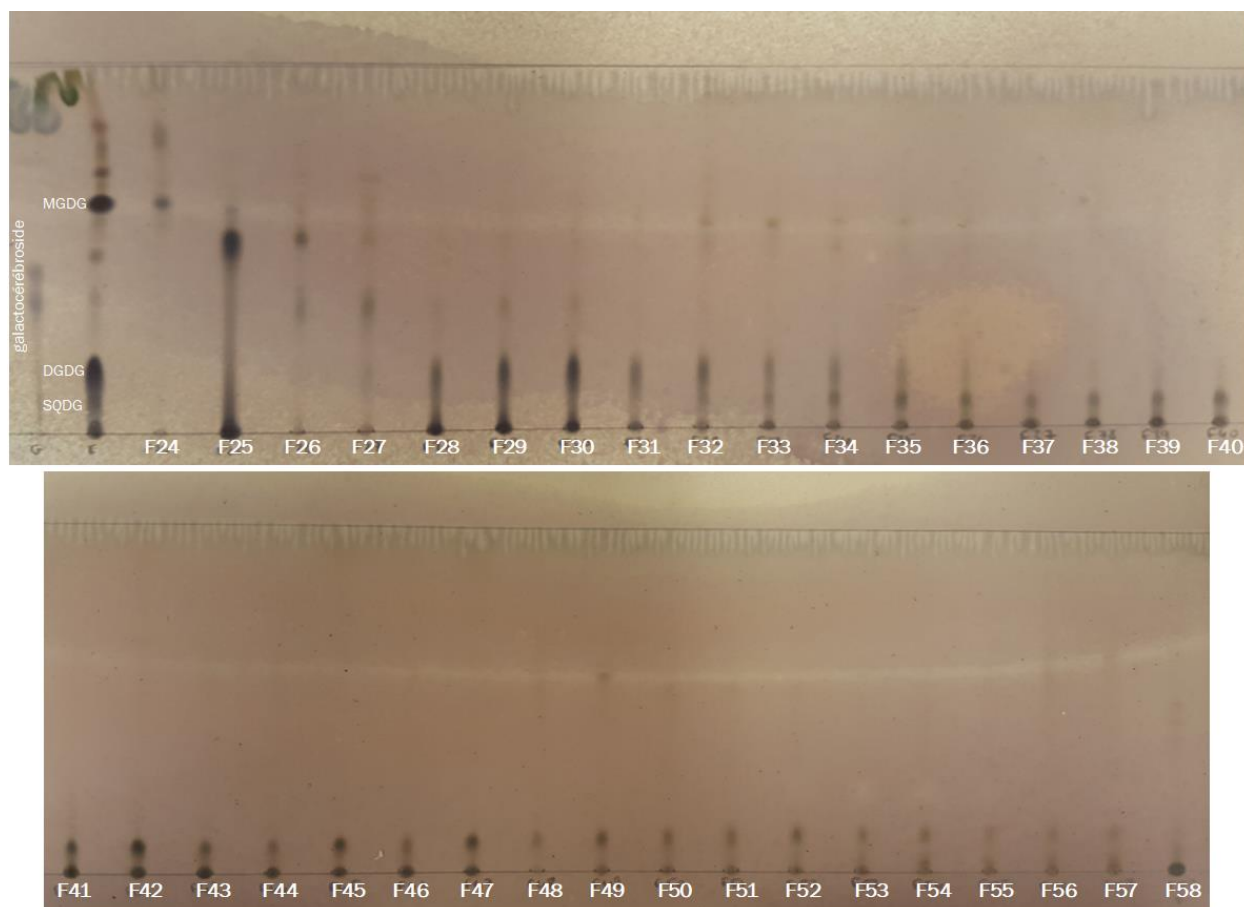


Figure 35. Profil en CCM des fractions F24 à F58 éluées avec de l'acétone (phase stationnaire silice ; phase mobile $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85 :15) ; révélateur orcinol)

Les fractions ont ensuite été testées pour leur activité cytotoxique à 1, 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur MCF-7 pendant 24, 48 et 72 h afin de cibler les fractions les plus actives. En fait, la sélection des fractions les plus actives reposait sur trois paramètres : la Cl_{50} calculée de manière empirique, l'effet dose-réponse et la cinétique d'activité. Quatre fractions ont été retenues pour un fractionnement plus poussé en vue de l'isolement de composés cytotoxiques, à savoir F6, F24, F25 et F47. La fraction de CH_2Cl_2 F6 contient des composés stéroliques (libres ou estérifiés) ainsi que des molécules plus polaires mais non extrapolables à une classe chimique (Figure 34). Les fractions acétoniques F24, F25 et F47 contiennent classiquement des molécules de type MGDG ou SQDG (Figure 35).

2.2.3.1. Fraction F6

La fraction F6 de CH_2Cl_2 a montré un effet cytotoxique dose-dépendant et durable avec une Cl_{50} de 15,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ après 72 h d'incubation. La fraction F6 (184,1 mg) a subi un sous-fractionnement par CCM

préparative en double élution, la première élution avec CH₂Cl₂/MeOH (90 :10) et la deuxième élution avec hexane/éther éthylique/acide acétique (50 :50 :1) (Figure 36). Ainsi, 18 sous-fractions ont été obtenues et analysées par CCM analytique : la migration a été effectuée en double élution comme mentionné ci-dessus et la révélation a été faite par pulvérisation de vanilline sulfurique (Figure 37).

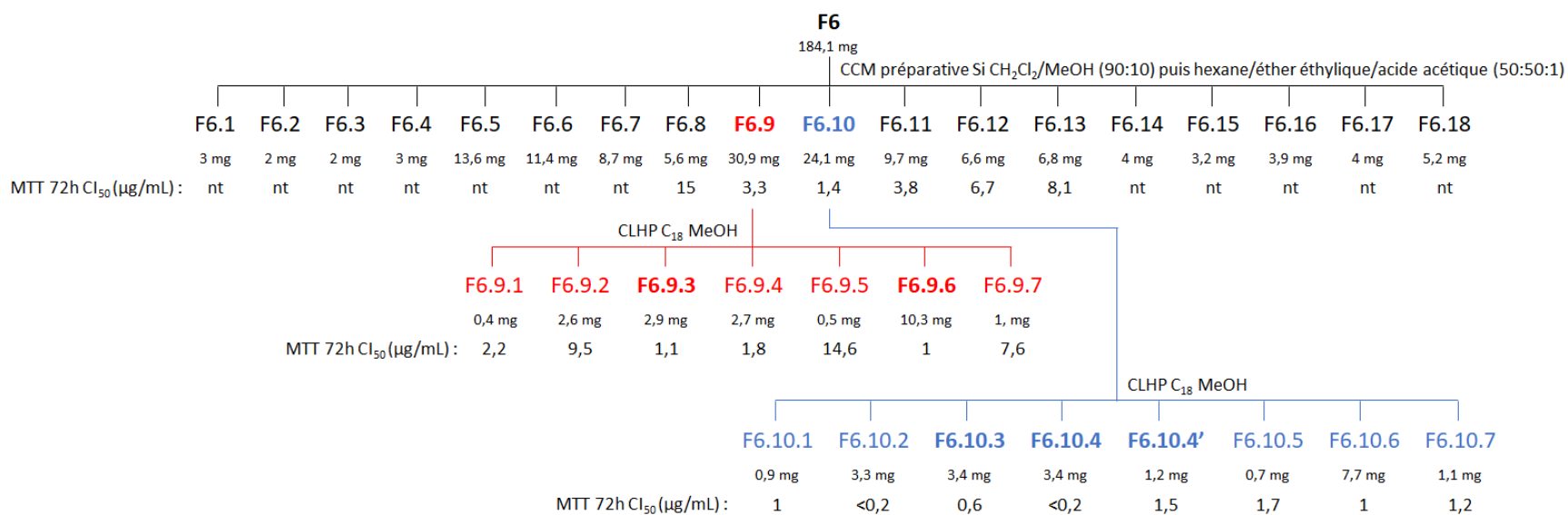


Figure 36. Schéma de fractionnement de la fraction F6 de CH₂Cl₂
(nt : non testé)

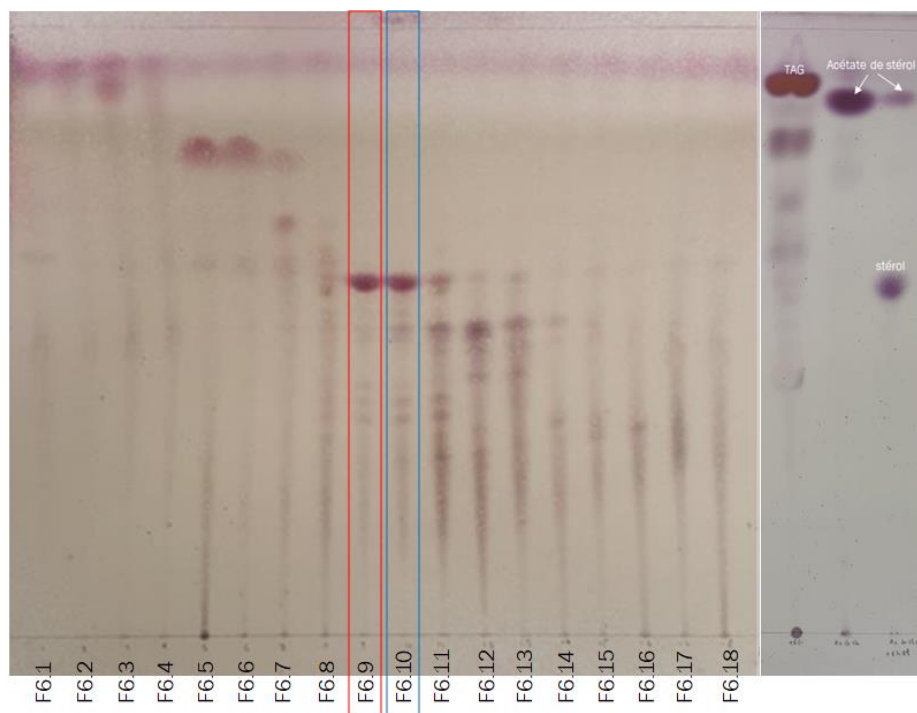


Figure 37. Profil en CCM des sous-fractions de F6
 (phase stationnaire silice ; phase mobile double élution $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90 :10)
 puis hexane/éther éthylique/acide acétique (50 :50 :1) ; révélateur vanilline sulfurique)

En fonction de la qualité de la séparation des composés, de la quantité obtenue pour chaque sous-fraction, et de leur complexité ou similarité éventuelle, il a été décidé de se focaliser uniquement sur les sous-fractions F6.8 à F6.13. La cytotoxicité a été évaluée au moyen du test MTT (0,05, 0,5, 5 et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La recherche bioguidée se poursuit sur F6.9 et F6.10 en raison de leur faible Cl_{50} (3,3 et 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement) et de leur masse suffisante (28 et 22,7 mg, respectivement). De plus, F6.9 et F6.10 ont une composition similaire dominée par des composés stéroliques. Les sous-fractions F6.9 (Figure 38) et F6.10 (Figure 39) ont ensuite été fractionnées par CLHP sur une colonne C_{18} et éluées avec du MeOH 100%.

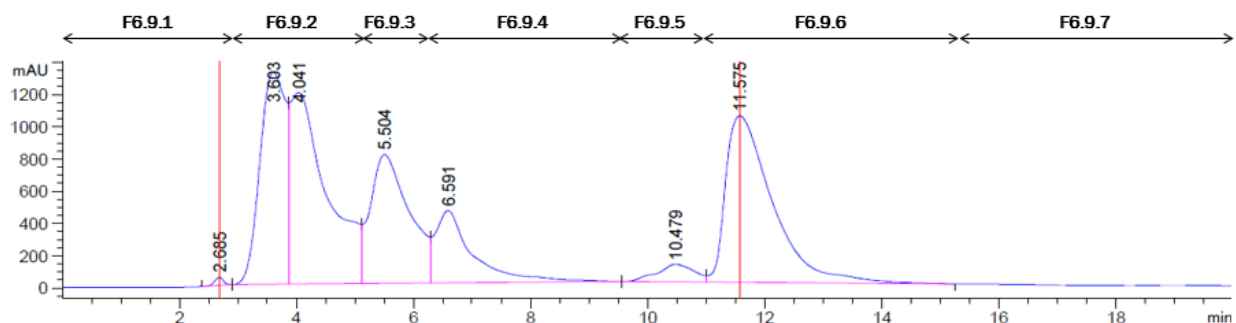


Figure 38. Chromatogramme obtenu par CLHP de F6.9 à 210 nm (phase stationnaire C_{18} ; phase mobile MeOH 100%)

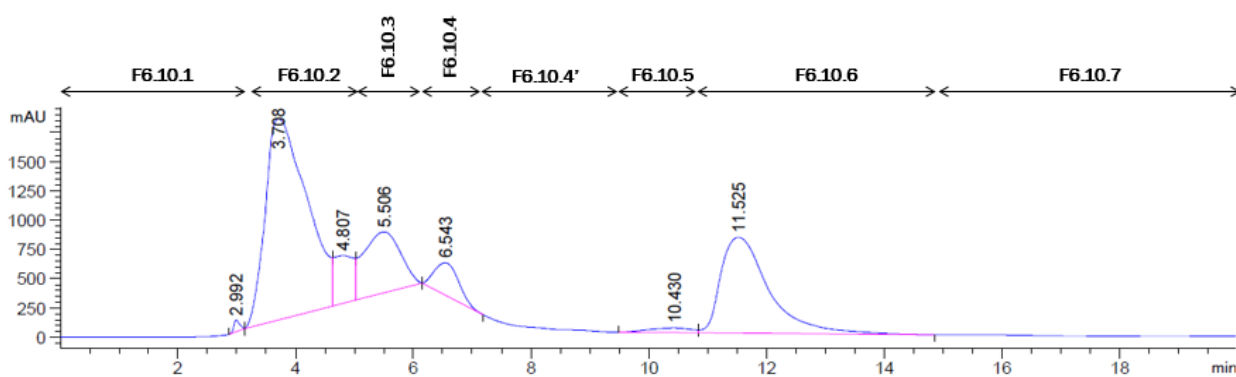


Figure 39. Chromatogramme obtenu par CLHP de F6.10 à 210 nm (phase stationnaire C_{18} ; phase mobile MeOH 100%)

Les sous-fractions issues de F6.9 et F6.10 ont ensuite été analysées par une CCM analytique (Figure 40 et 41, respectivement). La migration a été faite dans un mélange hexane/éther éthylique/acide acétique (50 :50 :1) et la révélation a été faite par pulvérisation de vanilline sulfurique. Selon la CCM de F6.9 et de F6.10, nous constatons un début de séparation au niveau des stérols avec des spots de couleurs différentes (violet pour F6.9.5 et F6.10.5 et rose pour F.6.9.6, F6.9.7, F6.10.6 et F6.10.7).

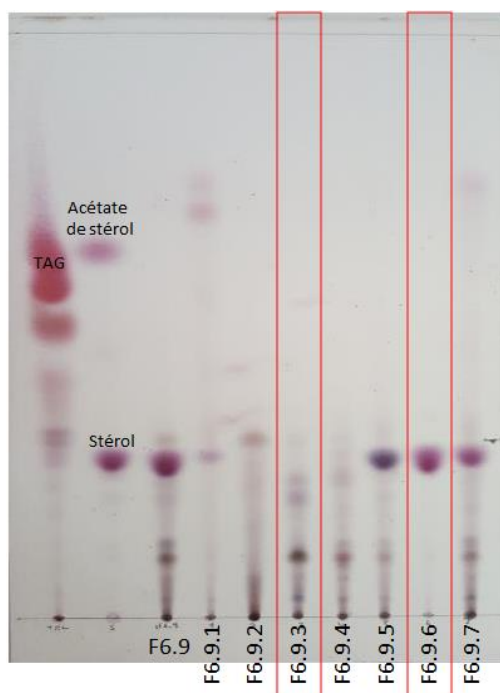


Figure 40. Profil en CCM des sous-fractions de F6.9
(phase stationnaire silice ; phase mobile hexane/éther éthylique/acide acétique (50 :50 :1) ;
révélateur vanilline sulfurique)

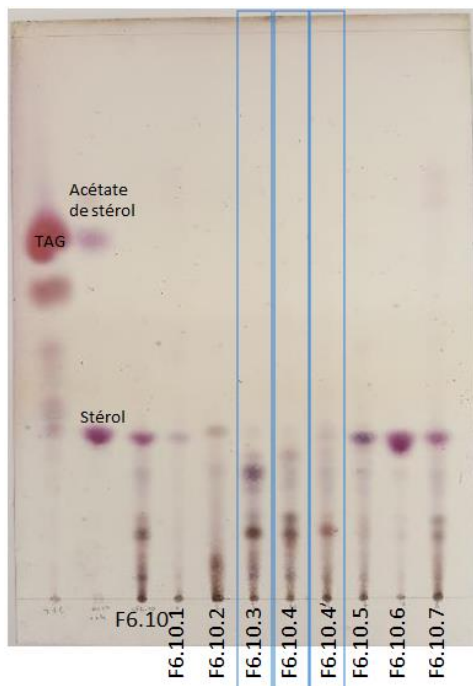


Figure 41. Profil en CCM des sous-fractions de F6.10
(phase stationnaire silice ; phase mobile hexane/éther éthylique/acide acétique (50 :50 :1) ;
révélateur vanilline sulfurique)

Ensuite, les différentes sous-fractions obtenues ont été testées pour leur activité cytotoxique. Les sous-fractions de F6.9 ont été testées à 0,625, 1,25, 2,5 et 5 µg/mL et celles de F6.10 à 0,2, 1, 5 et 25 µg/mL. F6.9.3, F.6.9.6, F6.10.3, F6.10.4 et F6.10.4' ont été sélectionnées pour la suite du travail. Les faibles masses obtenues ne permettent pas de poursuivre la purification de ces différentes sous-fractions dans les délais impartis. Des sous-fractions dont la composition semble similaire pourraient être utilisées afin d'aboutir à la purification et/ou l'identification des composés par des techniques de haute résolution (UPLC-HRMS-IT-TOF).

2.2.3.2. Fraction F24

La fraction acétonique F24 présentait une CI_{50} de 29,9 µg/mL sur MCF-7 et avait une masse de 1,2 g. Elle a été fractionnée par chromatographie sur colonne ouverte de silice (diamètre de la colonne 1,5 cm ; 12 g de silice ; hauteur de silice 18 cm ; lot de 100 mg d'échantillon), éluée successivement avec $CH_2Cl_2/MeOH$ allant de 98 :2 à 0 :100 (Figure 42). Ainsi, 17 sous-fractions de 20 mL chacune ont été collectées et analysées par CCM avec $CH_2Cl_2/MeOH$ (85 :15) comme phase mobile et la vanilline sulfurique comme révélateur (Figure 43).

Un test de cytotoxicité sur MCF-7 a ensuite été réalisé pour certaines fractions à différentes concentrations (0,05, 0,5, 5 et 50 µg/mL). F24.7, sous-fraction éluée avec $CH_2Cl_2/MeOH$ 87 :13, était la plus active et a été sélectionnée pour la suite.

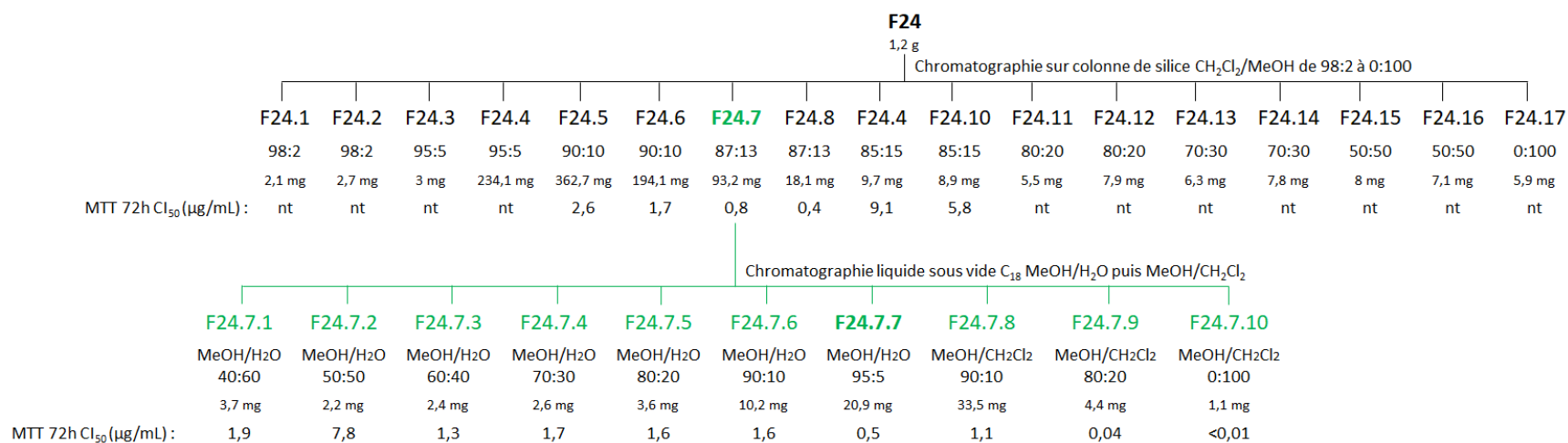


Figure 42. Schéma de fractionnement de la fraction acétonique F24
(nt : non testé)

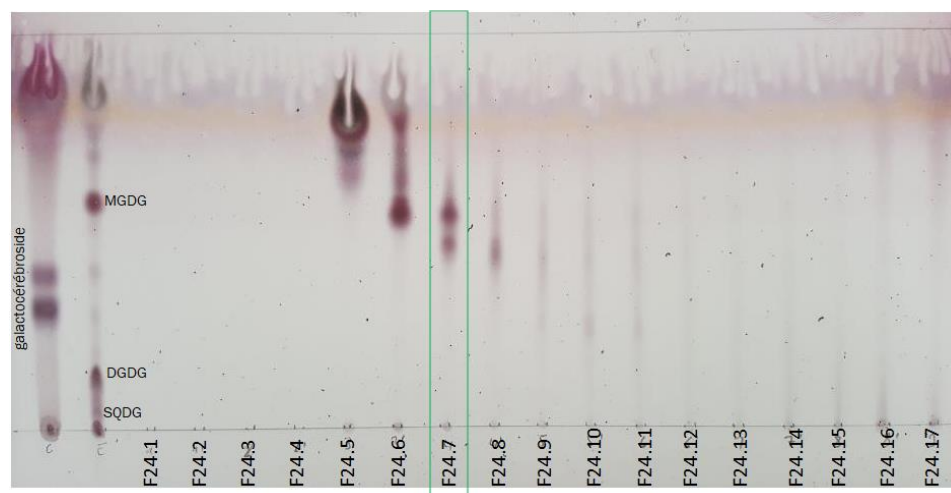


Figure 43. Profil en CCM des sous-fractions de F24
(phase stationnaire silice ; phase mobile CH₂Cl₂/MeOH (85 :15) ; révélateur vanilline sulfurique)

Ensuite, F24.7 (93,2 mg) a été fractionnée par chromatographie liquide sous vide sur colonne C₁₈ (diamètre de la colonne 1,5 cm ; 5 g de silice C₁₈ ; hauteur de silice C₁₈ 18 cm). L'élution a été réalisée par des mélanges de MeOH/H₂O (40 :60, 50 :50, 60 :40, 70 :30, 80 :20, 90 :10, 95 :5) puis de MeOH/CH₂Cl₂ (90 :10, 80 :20, 0 :100). Une CCM analytique des 10 sous-fractions obtenues (25 mL chacune) a été effectuée : la migration a été réalisée dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (85 :15) et la révélation a été faite par pulvérisation de vanilline sulfurique (Figure 44).

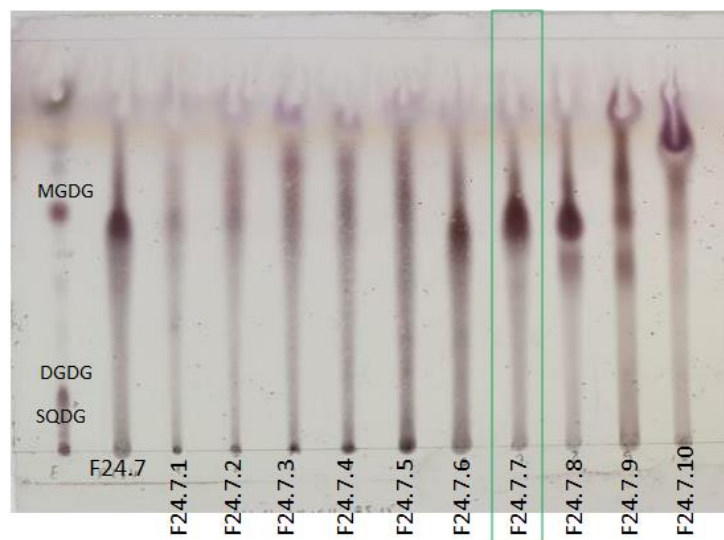


Figure 44. Profil en CCM des sous-fractions de F24.7
(phase stationnaire silice ; phase mobile CH₂Cl₂/MeOH (85 :15) ; révélateur vanilline sulfurique)

Les sous-fractions de F24.7 ont ensuite été testées à 0,01, 0,1, 1 et 10 µg/mL et l'activité cytotoxique était bien localisée dans F24.7.7 éluee avec MeOH/H₂O 95 :5 (20,9 mg). Selon la CCM (Figure 44), F24.7.7 semble contenir des composés de type MGDG. Néanmoins, une analyse plus fine est nécessaire, impliquant la purification de cette sous-fraction et/ou une analyse par CPG/SM pour déterminer les éléments structuraux. La purification de fractions de composition proche et pondéralement importantes permettrait d'apporter des éléments d'identification des molécules présentes et bioactives.

2.2.3.4. Fraction F25

La fraction acétonique F25 a montré une activité cytotoxique modérée dose-dépendante (Cl₅₀ de 78,9 µg/mL). Bien que sa Cl₅₀ soit supérieure à celle de l'extrait brut, nous avons examiné si cette fraction possédait un potentiel pro-apoptotique dans les cellules MCF-7. Nous avons d'abord effectué un double marquage par l'annexine et l'iodure de propidium de cellules non traitées et traitées avec

40 µg/mL de F25 pendant 24 h. L'analyse par cytométrie en flux montre que le pourcentage de cellules en phase tardive d'apoptose et nécrotiques augmente jusqu'à 5% dans les cellules traitées par rapport au contrôle (2,3 et 1,2%, respectivement) (Figure 45).

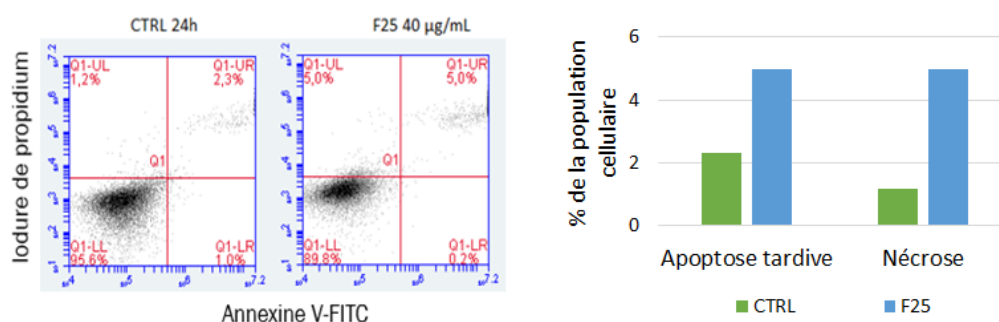


Figure 45. Détection de l'apoptose par cytométrie en flux après double marquage avec l'annexine V-FITC/IP après 24 h de traitement avec F25

Afin de déterminer le mécanisme responsable de la mort cellulaire induite par F25, l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose a été analysée par PCR quantitative. Les résultats montrent une augmentation de l'expression du gène pro-apoptotique Bax (1,7) et de la caspase-3 (1,9) et une diminution de l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2 (0,8) par rapport au contrôle défini comme 1 (Figure 46).

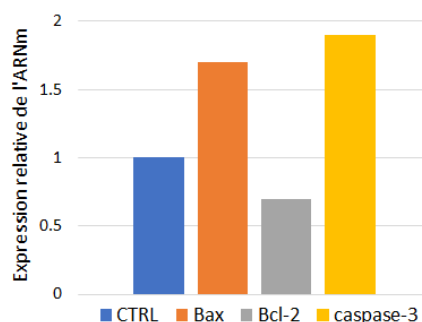


Figure 46. Niveaux relatifs d'expression d'ARNm de Bax, Bcl-2 et caspase-3 dans les cellules non traitées et traitées avec F25 pendant 24 h

La diminution de l'expression de Bcl-2 a été confirmée par Western Blot (0,55 par rapport au contrôle fixé à 1) (Figure 47). Une augmentation importante de l'expression de l'hémoprotéine cytochrome c (2,82) a également été observée (Figure 47).

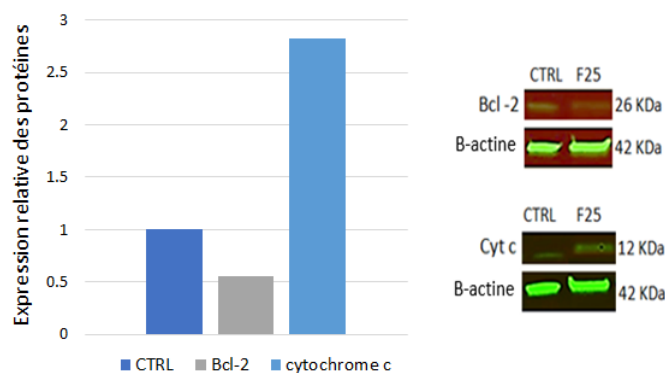


Figure 47. Niveaux d'expression des protéines impliquées dans l'apoptose dans les cellules MCF-7 traitées ou non avec F25 pendant 24 h, tels que déterminés par Western blot

À la suite des tests biologiques, le fractionnement de F25 se poursuit. Plusieurs essais chromatographiques ont été réalisés et ont chacun montré leurs limites. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence que des composés de polarité différente étaient présents dans F25. La fraction a d'abord été reprise dans un mélange MeOH/H₂O à 90 :10. Seule la fraction soluble (63 mg) dans ce mélange a montré la meilleure activité cytotoxique sur MCF-7 à 40 µg/mL. Celle-ci a ensuite été fractionnée par CLHP sur colonne C₁₈ (injection de 1,5 mg/150 µL de MeOH) avec un gradient d'élution de MeOH/H₂O allant de 75 :25 à 100 :0 (Figures 48 et 49). Au total, 23 sous-fractions ont été récupérées (1 sous-fraction toutes les 2 minutes) et testées pour leur potentiel cytotoxique sur MCF-7 à 40 µg/mL. Les résultats du test MTT montrent que l'activité était bien localisée dans la sous-fraction F25.18 (4,2 mg). Une analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (UPLC-HRMS-IT-TOF) a mis en évidence que cette sous-fraction était encore de composition complexe ; les différents pics *m/z* de F25.18 sont présentés à l'annexe 3. Les molécules de *L. papillosa* connues dans la bibliographie n'ont pas été trouvées lors de cette analyse.

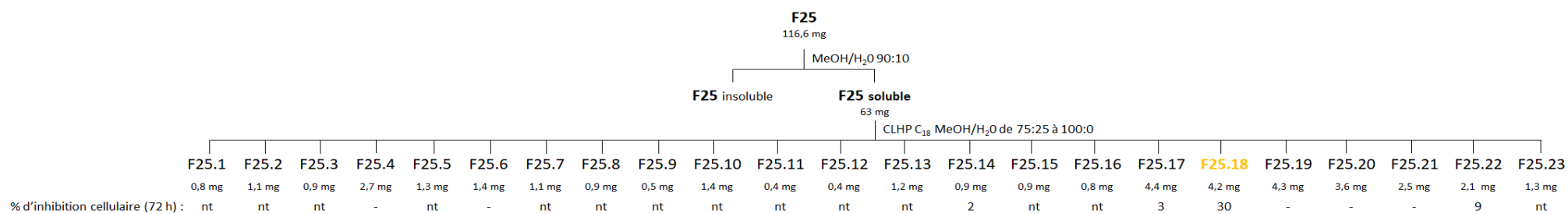


Figure 48. Schéma de fractionnement de la fraction acétonique F25
(nt : non testé, - : pas d'inhibition)

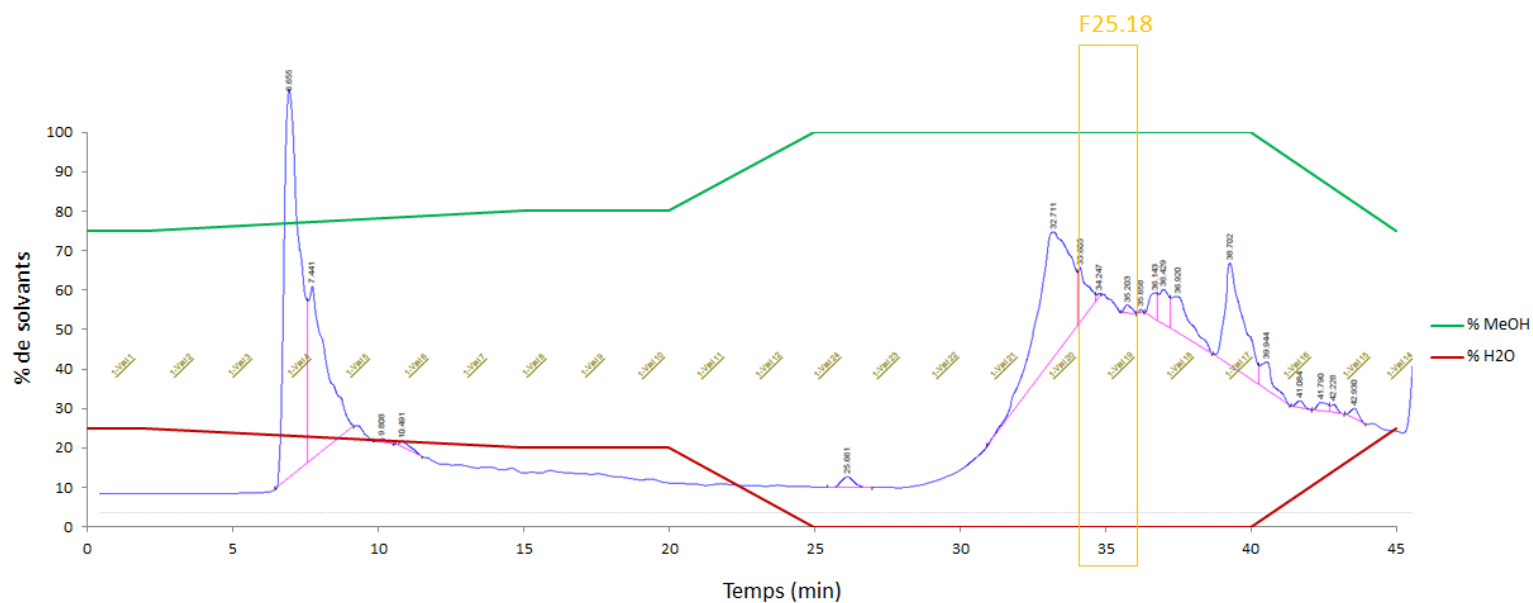


Figure 49. Chromatogramme obtenu par CLHP de F25 soluble à 254 nm
(phase stationnaire C₁₈; phase mobile gradient d'élution de MeOH/H₂O 75 :25 à 100 :0)

3.2.3.4. Fraction F47

Bien qu'elle ait une faible masse (12,4 mg), la fraction acétonique F47 semble intéressante, elle présentait une bonne CI_{50} de 29,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. F47 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a induit l'apoptose, comme en témoigne l'augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques précoces (15,1%) par rapport au contrôle (1,7%) et de l'expression du gène Bax (3,9), de la caspase-3 (1,5) et la diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 (0,89) après 24 h de traitement (Figures 50, 51 et 52).

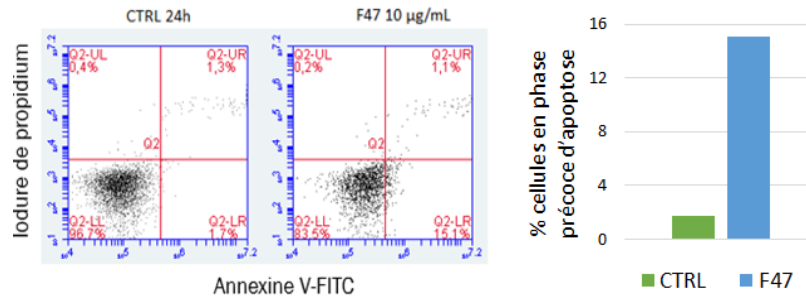


Figure 50. Détection de l'apoptose par cytométrie en flux après double marquage avec l'annexine V-FITC/IP après 24 h de traitement avec F47

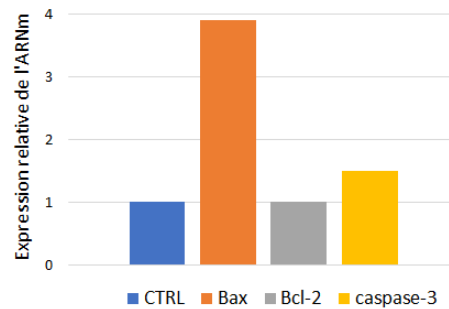


Figure 51. Niveaux relatifs d'expression d'ARNm de Bax, Bcl-2 et caspase-3 dans les cellules non traitées et traitées avec F47 pendant 24 h

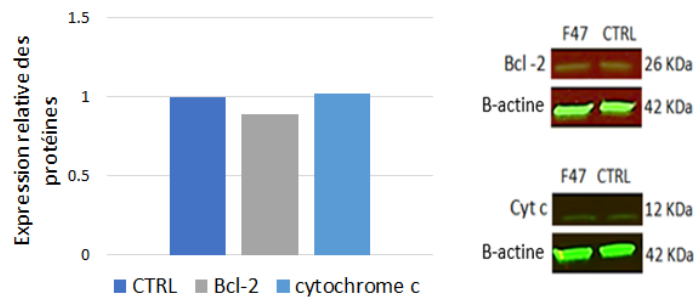


Figure 52. Niveaux d'expression des protéines impliquées dans l'apoptose dans les cellules MCF-7 traitées ou non avec F47 pendant 24 h, tels que déterminés par Western blot

F47 a été fractionnée par CLHP en phase normale avec gradient d'éluion de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ allant de 99,5 : 0,5 à 50 : 50 (Figures 53 et 54). Une collecte des sous-fractions par pic a permis l'obtention de 6 sous-fractions. En raison de leur faible masse, aucun test de cytotoxicité n'a été effectué et la purification a donc été interrompue.

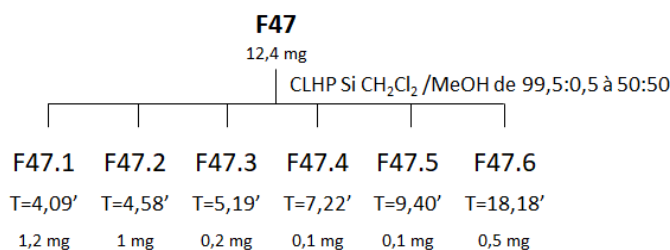


Figure 53. Schéma de fractionnement de la fraction acétonique F47

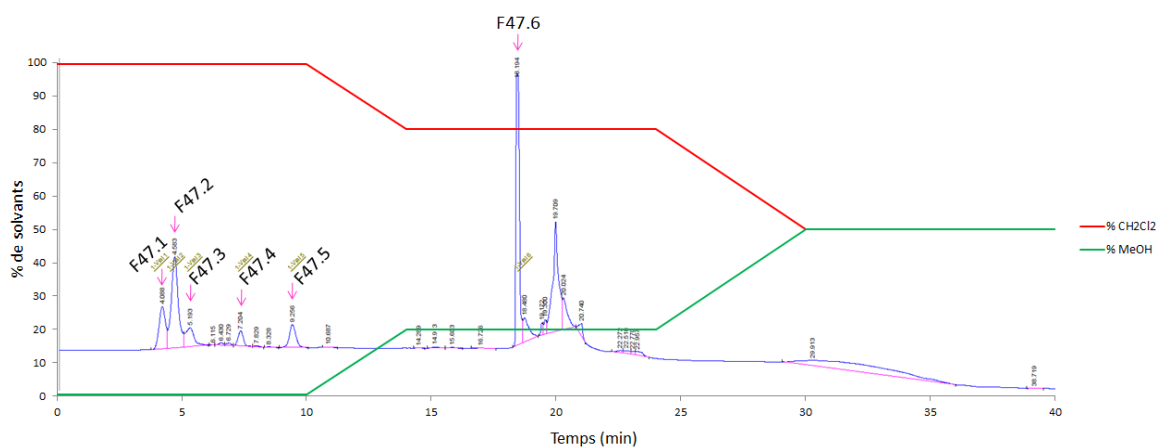


Figure 54. Chromatogramme obtenu par CLHP de F47 à 230 nm (phase stationnaire silice ; phase mobile gradient d'éluion de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99,5 : 0,5 à 50 : 50)

2.2.4. Discussion

Le présent travail visait à rechercher des composés cytotoxiques de la macroalgue marine rouge *Laurencia papillosa* de la côte libanaise. Pour ce faire, la première étape a consisté à préparer un extrait brut de la biomasse algale, suivi d'un test de son activité biologique. L'extrait brut $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50 : 50) de *L. papillosa* a montré une activité cytotoxique importante sur les cellules de cancer du sein MCF-7. Par conséquent, la recherche du composé responsable de cette activité a été réalisée par un fractionnement bioguidé. Dans cette partie, quatre fractions d'intérêt ont été sélectionnées pour être soumises à plusieurs étapes chromatographiques afin de purifier les composés responsables de l'activité cytotoxique. Malheureusement, jusqu'à présent, nous n'avons pas atteint notre objectif, lié en partie à

la complexité des différentes sous-fractions actives et aux faibles masses obtenues. Il sera donc nécessaire de poursuivre l'étape de purification des composés cytotoxiques de *L. papillosa* de la côte libanaise et de déterminer leur structure par des techniques spectroscopiques. Une fois que les composés d'intérêt sont isolés et identifiés, des évaluations biologiques plus poussées seront effectuées afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action dans les cellules cancéreuses du sein (apoptose, métabolisme des lipides, etc.).

3. Conclusion

L'obstacle majeur pour quiconque travaille dans le domaine des produits naturels est la quantité de matière première nécessaire pour mener à terme les travaux de purification, d'identification structurale et d'évaluation pharmacologique de composés bioactifs. Cette quantité de matière première à prélever doit être suffisante sans pour autant déséquilibrer l'écosystème et il n'y a pas de règle absolue. Malgré un prélèvement conséquent de *L. papillosa*, les différentes étapes de fractionnement n'ont pu aboutir à l'isolement de composés. L'autre obstacle auquel nous nous sommes heurtés concerne l'éloignement géographique du site de prélèvement et de prétraitement des échantillons (sous-traité au Liban) avec le laboratoire de fractionnement (en France). La quantité importante de macroalgue prélevée en mai 2016 a nécessité plusieurs mois de prétraitement (lavage et lyophilisation) et donc un délai dans la réception et l'étude des échantillons.

La déréplication est un concept d'identification de molécules connues alors que leur séparation physique est incomplète. La comparaison de spectres obtenus par CLHP/SMHR ou CLHP/RMN avec des banques de données et l'utilisation de filtres (critères taxonomiques, bioactivité) peuvent permettre de détecter dès les premières étapes de purification des molécules connues et donc de se focaliser plutôt vers les fractions bioactives à composés originaux. Les contraintes majeures résident dans la disponibilité des appareils de déréplication et l'existence de bases de données.

L'analyse déréplicative de nos fractions n'a pas non plus apporté d'arguments pour l'identification de molécules déjà connues, hormis le cholest-4-en-3-one. Aucune molécule précédemment identifiée chez *L. papillosa* n'a pu être détectée. Le genre *Laurencia* est particulièrement connu pour sa grande biodiversité, influencée non seulement par l'espèce, mais par les zones géographiques et climatiques (Harizani, Ioannou, and Roussis 2016). Néanmoins, en l'absence d'une base de données exhaustive et accessible des molécules répertoriées dans le genre *Laurencia* (plus de 1 000 composés identifiés à ce jour), la recherche s'est faite manuellement sur les principales molécules et s'est conclue par la

négative. Ce dernier résultat sera bien évidemment à prendre en compte en fonction de l'avancée des données de dérégulation mais laisse entrevoir le potentiel de nouveauté de *L. papillosa* et la nécessité de poursuivre les travaux de purification et d'identification.

Chapitre III. Etude de la composition lipidique de *Laurencia papillosa*

1. Contexte de l'étude

La composition lipidique de la macroalgue marine rouge *Laurencia papillosa* collectée de la côte libanaise n'a pas été étudiée auparavant. Pour cette raison, et parallèlement à la procédure de fractionnement à grande échelle, nous avons entamé une analyse lipidique de cette macroalgue. Selon la littérature, les lipides totaux sont extraits avec un mélange de CH₂Cl₂/MeOH (50 :50) puis fractionnés sur une colonne ouverte de gel de silice en classes de lipides à l'aide de trois solvants : les lipides neutres (tels stérols libres et terpènes) avec du CH₂Cl₂, les glycolipides non hydrosolubles avec de l'acétone et les phospholipides avec du MeOH (Kendel *et al.* 2013). Selon ces données, nous avons d'abord groupé proportionnellement les fractions de CH₂Cl₂ F1 à F23 pour former la fraction de lipides neutres (LN), les fractions acétoniques F24 à F58 pour former la fraction de glycolipides (GL) et les fractions de MeOH F59 à F78 pour former la fraction de phospholipides (PL). Ainsi, le présent travail s'articule autour de plusieurs points :

- La teneur en lipides et la distribution des classes de lipides,
- La composition en acides gras des lipides totaux,
- La composition en acides gras des trois classes de lipides,
- La composition en stérols de la fraction insaponifiable des lipides neutres,
- L'étude de l'activité cytotoxique des classes de lipides sur les cellules cancéreuses du sein MCF-7.

Les résultats présentés dans ce chapitre font l'objet d'une publication soumise dans le journal « Marine Drugs ». Néanmoins, il nous a paru nécessaire pour la compréhension de présenter la méthodologie adaptée pour l'interprétation des spectres car celle-ci n'est pas spécifiée dans l'article (voir l'annexe 4).

2. Présentation de la publication

Article

Lipid composition of the red marine macroalga *Laurencia papillosa* of the Lebanese coast and its cytotoxic activity

Josiane Elia¹, Karina Petit^{1,*}, Gaëtane Wielgosz-Collin¹, Aurélie Couzinet-Mossion¹, Mona Tannoury², Mona Diab-Assaf², Delphine Carbonnelle¹ and Hassan Nazih¹

¹ Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Nantes, Groupe Mer Molécules Santé MMS, EA 2160, EA 2160, 9 Rue Bias, BP 53508, F-44035 Nantes Cedex 1, France; josiane.elia@etu.univ-nantes.fr (J.O.); Gaetane.Wielgosz-Collin@univ-nantes.fr (G.W.-C.); Aurelie.Couzinet-Mossion@univ-nantes.fr (A.C.-M.); Delphine.Carbonnelle@univ-nantes.fr (D.C.); el-hassane.nazih@univ-nantes.fr (H.N.)

² Faculté des sciences II, EDST, Université libanaise, Fanar, Liban; monatannoury@yahoo.com (M.T.); mdiabassaf@ul.edu.lb (M.D.-A.)

* Correspondence: Karina.Petit@univ-nantes.fr (K.P.); Tel.: +33-687-083-401

Abstract: The fatty acid (FA) profile of the total lipids and each lipid class of *Laurencia papillosa* red macroalga collected from the Lebanese coast, as well as the sterol composition were determined in this study. Total lipids were extracted using dichloromethane/methanol (1:1) and then separated into neutral lipids (NL; dichloromethane), glycolipids (GL; acetone) and phospholipids (PL; methanol) on an open silica gel column. FAs and sterols were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry. Total lipid content was low, and the main lipid class was GL which exhibited an important cytotoxic activity on MCF-7 breast cancer cells. *L. papillosa* had a FA profile rich in saturated FAs, palmitic acid (C16:0) being the major. Oleic acid (C18:1 n-9) was the most predominant among monounsaturated FAs, followed by palmitoleic acid (C16:1 n-7). In addition, the macroalga contained a high content of C20 polyunsaturated FAs mainly arachidonic (C20:4 n-6) and eicosapentaenoic (C20:5 n-3) acids. Besides, several sterols have been identified, and cholesterol has been found to be the most dominant. Our results indicate that *L. papillosa* collected from the Lebanese coast has typical fatty acid profiles of red macroalgae.

Keywords: *Laurencia papillosa*; fatty acids; neutral lipids; glycolipids; phospholipids; sterols; cytotoxic activity

1. Introduction

Marine macroalgae are known to be an important source of functional natural products such as proteins, minerals, vitamins, lipids, and secondary metabolites including steroids and terpenes, which present nutritional value and health benefits, and possess various biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities [1].

Although macroalgae have a low lipid content [2], interest in algae lipids has increased in recent years due to their high content of polyunsaturated fatty acids mainly linoleic (C18:2 n-6), alpha-linolenic (C18:3 n-3), arachidonic (C20:4 n-6) and eicosapentaenoic (C20:5 n-3) acids [3,4]. These fatty acids are known as essential dietary components for humans because they cannot be synthesized by the human body and must therefore be obtained through diet. In addition to their role as structural components of cell membranes, they are precursors of eicosanoids including prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes which are bioregulators of various cellular processes [5]. They have also been found to reduce the risk of cardiovascular disease, osteoporosis, cancer and diabetes [6], and to exhibit antitumor, antibacterial and anti-inflammatory effects [7].

Moreover, marine macroalgae are a rich source of phytosterols. These lipid constituents of cell membranes regulate membrane fluidity and permeability and have been demonstrated to possess various biological activities such as antibacterial, antioxidant, anticancer, antidiabetic, and hypercholesterolemic activities [8].

The Lebanese coast offers a variety of species of marine macroalgae. However, there is not much data on the lipid profile of these marine organisms. *Laurencia papillosa*, belonging to the order Ceramiales and to the family Rhodomelaceae and widespread in the Lebanese coastal waters, was chosen for the current work.

Thus, a lipid analysis of this algal species collected from the Lebanese coast was carried out for the first time to broaden our knowledge of their composition. This study aims to determine the fatty acid composition of the total lipids (TL), neutral lipids (NL), glycolipids (GL) and phospholipids (PL) fractions of the marine red macroalga *Laurencia papillosa*, as well as the sterol composition of the NL. In addition, the crude lipid extract and lipid class fractions were evaluated for their cytotoxic activity on human breast cancer cells MCF-7.

2. Results and Discussion

2.1. Total lipid content and lipid classes distribution

In agreement with the literature that the total lipid content of marine macroalgae is generally less than 5% of dry weight [2], that of *Laurencia papillosa* in this study was 0.74%. Our result is relatively similar to those of the previously studied *L. papillosa* species collected from the west coast of the Red Sea (0.81% [9], 0.88% [10]) and from the Gujarat coast in India (1.73% [11]). The value obtained in this study also shows a similarity with that reported for other species of the genus *Laurencia*, it ranged from 0.3 to 1.53% dry weight: 0.30% in *L. caspica* collected from the south coast of the Caspian Sea at Ramsar and 0.90% in the province of Sisangan [12], 0.47% in *L. intermedia* from the Kenyan coast [13], 1.1% in *L. intricata* from the Brazilian coast [5], 1.53% in *L. cruciata* from Gujarat, India [11,14]. On the contrary, this value was lower than that reported for *L. filiformis* with 6.2% dry weight [5].

In the lipid extract of algae, we find mainly three classes of lipids: neutral lipids (NL), glycolipids (GL) and phospholipids (PL) [15]. In the present study, the main lipid class was GL (47.6%) followed by NL and PL which accounted for 31.42% and 20.98% of total lipids, respectively. According to El Baroty *et al.* (2011), an amount of GL of 22.5% of total lipids was found in *L. papillosa* [10], a value lower than that found in this study. On the other hand, our results were in agreement with those reported by Le Tutour (1990), Bhaskar *et al.* (2004) and Khotimchenko (2005) in that GL are the major lipid class in marine algae followed by NL and PL [16]. In addition, some reports have shown that PL content ranges from 10% to 20-21% of total lipids in algae [17,18], see in species of red algae [16], which is in consistent with our result. On the contrary, the amount of PL obtained in our study was not in agreement with those obtained by Abd El Baky *et al.* (2014) for the same species (8.7% of total lipids) [9], and by Dembitsky and Rozentsvet (1990) for *L. coronopus* (9.8% of total lipids) [19].

2.2. Fatty acid composition

2.2.1. Fatty acid composition of total lipids

In the present study, a variety of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids were identified in *L. papillosa*. The fatty acid composition of the total lipids is reported in Table 1.

Table 1. Global profile of fatty acids (%) in *Laurencia papillosa*.

Fatty Acid	Total Lipids
C14:0	3.95
C15:0	tr ¹
C16:0	39.13
C18:0	5.46
C20:0	5.01
C21:0	tr
C22:0	tr
C24:0	tr
∑SFAs	53.55
C14:1 n-5	tr
C16:1 n-7	6.24
C18:1 n-9	9.35
C20:1 n-9	tr
C22:1 n-9	tr
∑MUFAs	15.59
C16:3 n-3	tr
C16:2 n-6	tr
C18:3 n-3	tr
C18:2 n-6	2.02
C20:5 n-3	14.25
C20:4 n-6	13.11
C20:3 n-6	1.48
C20:2 n-6	tr
∑PUFAs	30.86
∑n-6 PUFAs	16.61
∑n-3 PUFAs	14.25
∑ n-6/n-3	1.17

¹ Trace.

Regarding the sum of fatty acids in this study, the total sum of SFAs, MUFAs and PUFAs followed the order SFAs > PUFAs > MUFAs. This result showed a similarity with other studies on the *Laurencia* species [5,20-23].

In the present study, the sum of SFAs was 53.55% of the TFAs. The main SFA was found to be palmitic acid (C16:0) with 39.13% of total fatty acids (TFAs), followed by stearic acid (C18:0; 5.46%). A similar observation was reported for the same species [11,20,21] and for others of the same genus [11,13,14,21-23], where palmitic acid is the predominant SFA representing 32.5 to 55.4%.

L. papillosa had a proportion of MUFAs of 15.59% of TFAs and oleic acid (C18:1 n-9; 9.35%) was the predominant MUFA followed by palmitoleic acid (C16:1 n-7; 6.24%). These two MUFAs are often reported as the majors MUFAs in *Laurencia* species [11–13,20-22].

The PUFAs content was 30.86% of TFAs. Arachidonic acid (C20:4 n-6; 13.11%) and eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3; 14.25%) were the main PUFAs in *L. papillosa*. This result is consistent with previous studies, where it was reported that this two FAs are the main PUFAs in *Laurencia* species [11,12,20,22,23]. Moreover, *L. papillosa* was richer in C20 PUFAs (28.84%) than in C18 PUFAs (2.02%), which is comparable to some reports on these species [5,11,12,20,22,23]. In addition, we noticed that the n-6 PUFAs content was higher than that of the n-3 PUFAs in *L. papillosa*, which is consistent with previous studies [14,24]. Namely, an ideal ratio of n-6/n-3 not exceeding 10 in a diet is recommended by the World Health Organization to prevent inflammatory, cardiovascular and nervous system disorders. The n-6/n-3 ratio in this study was 1.17.

Overall, our findings agree with what has been described in the literature that red algae are characterized by a very high level of SFAs with C16:0 as the major one [3,16,25,26], the presence of oleic acid (C18:1 n-9) as one of the abundant fatty acids among MUFAs [3,25,26], a high content of PUFAs C20 mainly arachidonic (20: 4 n-6) and eicosapentaenoic (20:5 n-3) acids [3,16,25-27], and a higher proportion of n-6 PUFAs than n-3 PUFAs [7]. Furthermore, it has been reported that docosahexaenoic acid (C22:6 n-3) is often absent from red algae or when present at low concentrations [3,7], which is consistent with our results, it is absent.

2.2.2. Fatty acid composition of lipid classes

The fatty acid profiles of the lipid classes (NL, GL and PL) are presented in Table 2. Twenty-one FAs were identified (19 in LN, 14 in GL and 12 in PL) and they did not differ markedly from each other.

Table 2. Fatty acid profile (%) of the lipid classes in *Laurencia papillosa*.

Fatty Acid	Neutral Lipids	Glycolipids	Phospholipids
C14:0	4.44	4.08	5.28
C15:0	1.93	0.21	0.71
C16:0	33.46	44.44	40.10
C18:0	3.60	0.90	4.16
C20:0	1.31	0.28	nd
C21:0	nd ¹	nd	2.01
C22:0	0.29	nd	nd
C24:0	0.23	0.21	nd
ΣSFAs	45.26	50.12	52.26

C14:1 n-5	0.78	nd	nd
C16:1 n-7	9.85	1.41	4.05
C18:1 n-9	12.98	13.03	25.22
C20:1 n-9	1.50	nd	0.92
C22:1 n-9	0.28	0.82	nd
ΣMUFAs	25.39	15.26	30.19
C16:3 n-3	0.27	nd	nd
C16:2 n-6	Nd	1.23	nd
C18:3 n-3	0.24	nd	nd
C18:2 n-6	2.24	2.16	0.86
C20:5 n-3	17.10	0.23	4.45
C20:4 n-6	8.33	29.62	6.85
C20:3 n-6	0.95	1.38	5.39
C20:2 n-6	0.22	nd	nd
ΣPUFAs	29.35	34.62	17.55

¹ not detected.

NL, GL and PL consisted of SFAs (45.26, 50.12 and 52.26% of TFAs, respectively), MUFAs (25.39, 15.26 and 30.19%, respectively) and PUFAs (29.35, 34.62 and 17.55%, respectively). For LN and GL, the sum of the SFAs appeared in the highest percentage, followed by that of the PUFAs and MUFAs, while for PL, the sum of the FAs followed the following order SFAs > MUFAs > PUFAs.

The main SFA in the three lipid classes was palmitic acid accounted for 33.46% in LN, 44.44% in GL and 40.10% in PL. While oleic acid (C18:1 n-9) was the most abundant among the MUFAs and it was found to occur at 12.98% in LN, 13.03% in GL and 25.22% in PL. The predominant PUFA was arachidonic acid in GL and PL and was found to be 29.62 and 6.85% respectively, while eicosapentaenoic acid (17.10%) was the major in LN PUFAs. In addition, the three main lipid classes were characterized by the presence of large amounts of C20 PUFAs.

According to the literature, a previous report by Abd El Baky *et al.* (2014) indicated a similar percentage of C14:0, C18:0, C20:3, and a dominance of C16:0, as the major SFA, and C20 PUFAs in the PL fraction of *L. papillosa* [9]. Similarly, El Baroty *et al.* (2011) determined the FA composition of *Laurencia's* GL and found that the GL fraction had a high content of SFAs (75.98%), palmitic acid being the main one (61.21%), that oleic acid (C18:1) was the most dominant among the MUFAs (3.67%), and that C20 PUFAs were the most prevalent [10]. This alga also contained a large amount (7.61%) of margaric acid (C17:0) that was not found in the present study.

2.2.3. Sterol composition of neutral lipids

The sterol composition of the unsaponifiable fraction of NL class of *L. papillosa* was determined and is presented in Table 3.

Table 3. Sterol composition of neutral lipids.

Sterol	Structure	[M] ⁺	%
22-dehydrocholesterol	C27:2 $\Delta^{5,22}$	384	0.88
Cholesterol	C27:1 Δ^5	386	67.66
Desmosterol	C27:2 $\Delta^{5,24}$	384	21.78
24-methylenecholesterol	C28:2 $\Delta^{5,24(28)}$	398	1.79
Campesterol	C28:1 Δ^5	400	0.63
Cholest-4-ene-3-one	C ₂₇ H ₄₄ O	384	0.52
Cholesta-4,6-dien-3-one	C ₂₇ H ₄₂ O	382	1.05
Sitosterol	C29:1 Δ^5	414	2.44
Fucoesterol	C29:2 $\Delta^{5,24(28)}$	412	3.26

Nine sterols were identified by GC-MS, and cholesterol (C27:1 Δ^5) was found to be the main one (67.66%). In the mass spectrum, its molecular ion [M⁺] peak was at m/z 386 and corresponded to the molecular formula C₂₇H₄₆O. This is in agreement with the literature indicating that *L. papillosa* species and those of the genus *Laurencia* contain mainly cholesterol in a high percentage of dry weight (68.7-100%) [22,28,29].

Two other C27-sterols commonly found in red algae and in *Laurencia* were detected in this study, desmosterol and 22-dehydrocholesterol. Desmosterol (C27:2 $\Delta^{5,24}$) with a retention time of 1.02 represented 21.78%, this value was higher than those reported by Gibbons *et al.* (1967) in *L. pinnatifida* (2%) [30], and by Aknin *et al.* (1990) in *L. obtusa* (0.9 %) and *L. pinnatifida* (0.4 %) [22]. On the other hand, our result did not agree with those of Al Easa *et al.* (1995) who did not find desmosterol in *L. papillosa*, *L. paniculata* and *L. obtusa* [29,31]. 22-dehydrocholesterol (C27:2 $\Delta^{5,22}$) with a relative retention time shorter than that of cholesterol (RRT = 1.00) was present in a very small proportion of 0.88%, in agreement with the results of Penna Lisboa *et al.* (1982) on *L. papillosa* harvested in Brazil [28], and with some of those of Aknin *et al.* (1990) on *L. microcladia* and *L. pinnatifida* which showed 0.9 and 1.3 % of 22-dehydrocholesterol, respectively [22]. In contrast, 22-dehydrocholesterol was found in larger amounts in *L. obtusa* and *L. intricata* with 6.5 and 3.6%, respectively [22], while it was absent in *L. papillosa*, *L. paniculata* and *L. obtusa* [29,31].

C28 and C29 sterols were also present but in small quantities such as 24-methylenecholesterol (C28:2 $\Delta^{5,24(24')}$), campesterol (C28:1 Δ^5), sitosterol (C29:1 Δ^5) and fucoesterol (C29:2 $\Delta^{5,24(24')}$). These

sterols were similarly detected in *L. papillosa* collected from Brazil [28], while they were absent from *L. papillosa* collected from Qatar [29].

Cholestenol (C27:0), lathosterol (C27:1 Δ^7), brassicasterol (C28:2 $\Delta^{5,22}$), stigmasterol and poriferasterol (C29:2 $\Delta^{5,22}$), isofucosterol (C29:2 $\Delta^{5,24(28)}$) found in certain species of *Laurencia* [22,28], were not detected in the present study, as was the case in the study of Al Easa *et al.* (1995) on *L. papillosa* and *L. paniculata* [29].

The sterol lipid molecule cholest-4-en-3-one (C₂₇H₄₄O) has also been detected in this study as a minor component (0.52%), as well as cholesta-4,6-dien-3-one (C₂₇H₄₂O; 1.05%), a product of the oxidation of cholesterol. In addition, a small proportion of hydrocarbons, squalene (C₃₀H₅₀; 0.51%), was present in the unsaponifiable fraction of NL, as well as another compound, α -tocopherol (C₂₉H₅₀O₂; 0.82 %) a type of vitamin E.

Overall, our results are in agreement with previous findings that C27 sterols are frequently the most detected in red marine macroalgae with cholesterol being the dominant one [22,25,29,32]. In addition, C28 and C29 sterols have been identified in some red algae in varying amounts [25,32], which is consistent with our case.

2.3. Cytotoxic activity on MCF-7 human breast cancer cells

The lipid extract and the three main lipid classes of *L. papillosa* were evaluated for their cytotoxic activity on MCF-7 cells. The lipid extract was active against MCF-7 cells with an IC₅₀ of 35.6 μ g/mL after 72 h of incubation. Of the three lipid classes, the GL fraction had the best activity on MCF-7 cells with an IC₅₀ value of 5.92 μ g/mL, while the NL fraction showed moderate cytotoxicity (IC₅₀ of 10.53 μ g/mL). The PL fraction was found to have no cytotoxic activity on MCF-7 cells (IC₅₀ > 50 μ g/mL).

3. Materials and Methods

3.1. Algae sample

Laurencia papillosa was collected from the Lebanese coast in May 2016. The fresh alga was thoroughly cleaned to remove sand, epiphytes and other extraneous materials. The sample was then freeze-dried and finely ground.

3.2. Lipid extraction

The dried, powdered sample (692 g) was extracted three times with dichloromethane/methanol (CH₂Cl₂/MeOH, 1:1, v/v) at room temperature with continuous stirring. The combined extracts were filtered, evaporated using a rotary evaporator at 40°C and then partitioned between dichloromethane

and water ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, 0.65:0.35, v/v). The organic phase was collected, dried over anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4), filtered and concentrated to dryness to yield the total lipids (5.09 g). The lipid content was determined as a percentage of the dry weight, total lipid content = (weight of lipids/weight of the dry sample) \times 100.

3.3. Separation of lipid classes

The lipids (5.01 g) were fractionated into neutral lipids (dichloromethane), glycolipids (acetone), and phospholipids (methanol) on an open silica gel column chromatography (column diameter of 3 cm, silica height of 36 cm). The collected fractions were concentrated to dryness and weighed. The percentage of each lipid class was determined as a percentage of total lipids.

3.4. Fatty acid and sterol composition

3.4.1. Saponification

Lipid extract and neutral lipids (50 mg each) were first saponified with 2M ethanolic potassium hydroxide solution at 80°C for 1 h 30 min. The mixture was then extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. Two phases were thus obtained: the organic phase containing the sterols, and the aqueous phase containing the fatty acids.

3.4.2. Sterols

The organic phase obtained from the NL was dried over anhydrous Na_2SO_4 . The supernatant was collected and evaporated. A part of the free sterols was analyzed by GC-MS, and another portion (25 mg) was converted to sterol acetate. Acetylation was performed by the addition of acetic anhydride supplemented with pyridine. The mixture containing sterol acetates was reacted overnight in the dark and at room temperature and was then extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. The organic phase was washed successively with 2M hydrochloric acid then with a saturated solution of sodium bicarbonate. The aqueous phase was removed, and the organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The sterol acetates were then analyzed by GC-MS.

3.4.3. Fatty acids

The aqueous phase obtained from the saponification was acidified by 2M hydrochloric acid to obtain a pH of 4-5. The fatty acids were then extracted with CH_2Cl_2 . The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The FAs were then converted to Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) which in turn were transformed to N-Acyl Pyrrolidides (NAPs) as stated below.

3.4.4. Methanolysis

The FAMES of glycolipids (10 mg) were obtained by acid methanolysis using methanol/water/hydrochloric acid (29:4:3, v/v/v) (80°C for 1 h 30 min). Subsequently, the reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂/H₂O. The organic phase containing the FAMES was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The FAMES were thereafter transformed into NAPs as described below.

3.4.5. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) and N-Acyl Pyrrolidides (NAPs)

FAs were converted to methyl esters by transmethylation using 6% methanolic hydrogen chloride (80°C for 1 h). FAMES were then extracted with CH₂Cl₂/H₂O, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, evaporated, and finally analyzed by GC-MS. A part of these FAMES was subsequently transformed into NAPs using pyrrolidine/acetic acid (5:1 v/v) (85°C for 1 h). The reaction mixture was then extracted with CH₂Cl₂/H₂O, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated. The NAPs were finally analyzed by GC-MS.

3.4.6. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analyses

Hewlett-Packard HP 6890 Gas Chromatograph coupled to an HP 6890 Mass Spectrometer and consisting of a capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm) was used. The carrier gas was helium with a column flow rate of 1 mL/min. The analyses were performed by electron impact ionization with an energy of ionizing electrons of 70 electron volts. A splitless injection for the capillary GC was used. The detector and injector temperatures were 280 and 250°C, respectively. The temperature for FAMES was maintained at 170°C for 4 min then elevated at 300°C at 3°C/min, that for NAPs at 200°C for 4 min followed by a 3°C/min ramp up to 300°C then maintained for 25 min, and that for sterols at 200°C then raised to 310°C by a rate of 3°C/min and maintained for 25 min. The identification of FAs (FAMES and NAPs) and sterols (free and acetates) was done according to their mass spectra by comparing their retention times and equivalent chain length values with those of a standard.

3.5. Cell line and culture

MCF-7 breast cancer cell line was obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, United Kingdom). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine and 1% penicillin-streptomycin at 37°C under a controlled atmosphere of 5% CO₂.

3.6. MTT assay

The cytotoxic activity of the algal extract and its fractions on MCF-7 cells was examined using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells (10^4 /well) were cultured in quadruplicate in 96-well plates and incubated at 37°C. After 24 h, they were treated with various concentrations of the algal samples and then incubated for 24, 48 and 72 h at 37°C. The negative control used was DMEM-0.1% bovine serum albumin containing 0.2% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). After the desired treatment time, 100 μ L of the medium was removed and 50 μ L of MTT solution (2.5 mg/mL) was added to each well. After incubating the plates for 4 h at 37°C, the medium was carefully removed, 200 μ L of DMSO was added to each well and mixed to solubilize formazan. Absorbance was measured at 570 nm using a SpectraMax 190 microplate reader. The IC_{50} indicating the concentration of the sample inhibiting 50% of cell growth was determined graphically.

4. Conclusions

This is the first time that a lipid analysis of *Laurencia papillosa* collected from the Lebanese coast has been performed in order to expand our knowledge of their composition. The present study indicates that *L. papillosa* of the Lebanese coast has profiles of fatty acids and sterols typical of red algae. Although its total lipid content was low, *L. papillosa* was rich in n-6 and n-3 PUFAs that are considered essential fatty acids for humans, precursors of eicosanoids and have beneficial health effects [5,6]. Several sterols have been identified in this alga and cholesterol was found to be the dominant. In addition, *L. papillosa* was characterized by its high content of glycolipids which showed an important cytotoxic activity on MCF-7 breast cancer cells. Further investigations are needed to purify and identify the compounds responsible for this cytotoxic activity. Moreover, given that the lipid content and the fatty acid and sterol composition can vary for the same algal species [3], it would be important to examine the effects of seasonal and geographical variations on the lipid composition of *L. papillosa*.

Acknowledgments: This work was supported by the Islamic Center Association for Guidance and Higher Education, Lebanon. The authors would like to thank Vony Rabesaotra from the University of Nantes, Mer-Molécules-Santé laboratory, EA 2160, for her technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Peng, Y.; Hu, J.; Yang, B.; Lin, X.-P.; Zhou, X.-F.; Yang, X.-W.; Liu, Y. Chapter 5 - Chemical composition of seaweeds. In *Seaweed Sustainability*; Tiwari, B.K., Troy, D.J., Eds.; Academic Press: San Diego, 2015; pp. 79–124 ISBN 978-0-12-418697-2.
2. Kim, S.-K.; Lee, C.-G. chapter 6: Fermentation Techniques in Bioenergy Production. In *Marine Bioenergy: Trends and Developments*; CRC Press, 2015; p. 115 ISBN 978-1-4822-2238-8.
3. Wielgosz-Collin, G.; Kendel, M.; Couzinet-Mossion, A. Chapter 7 - Lipids, Fatty Acids, Glycolipids, and Phospholipids. In *Seaweed in Health and Disease Prevention*; Academic Press: San Diego, 2016; pp. 185–221 ISBN 978-0-12-802772-1.
4. Khotimchenko, S.V. The Fatty Acid Composition of Glycolipids of Marine Macrophytes. *Russ. J. Mar. Biol.* **2003**, 29, 126–128.
5. Gressler, V.; Yokoya, N.S.; Fujii, M.T.; Colepicolo, P.; Filho, J.M.; Torres, R.P.; Pinto, E. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chem.* **2010**, 120, 585–590.
6. Mišurcová, L.; Ambrožová, J.; Samek, D. Seaweed lipids as nutraceuticals. *Adv. Food Nutr. Res.* **2011**, 64, 339–355.
7. Abdullah, H.; Abdullah, N.S. FATTY ACIDS PROFILES OF RED SEAWEED, *GRACILARIA MANILAENSIS*. *international journal of science and technology* **2013**, 11, 726–732.
8. Kim, S.-K.; Ta, Q.V. Potential beneficial effects of marine algal sterols on human health. *Adv. Food Nutr. Res.* **2011**, 64, 191–198.
9. Abd El Baky, H.; El Baz, F.K.; El baroty, G.; Asker, M.; Ibrahim, E.A. Phospholipids of some marine macroalgae: Identification, antiviral, anticancer and antimicrobial bioactivities. *Pharma Chem.* **2014**, 6, 370–382.
10. El Baroty, G.; Baz, E.; F.K.; I, A.-E.; El-Baky, A.; Hanaa, H.; M.m, A.; A, I.E. Evaluation of glycolipids of some Egyptian marine algae as a source of bioactive substances. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem* **2011**, 10, 2114–2128.
11. Kumari, P.; Kumar, M.; Gupta, V.; Reddy, C.R.K.; Jha, B. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chem.* **2010**, 120, 749–757.
12. Mehdipour, N.; Sheijooni Fumani, N.; Rahnama, R. Proximate and Fatty acid Composition of the Southern Caspian Sea Macroalgae. *J. Persian Gulf* **2014**, 5, 63–72.
13. Muraguri, E.N.; Wakibia, J.G.; Kinyuru, J.N. Chemical Composition and Functional Properties of Selected Seaweeds from the Kenya Coast. *J. Food Res.* **2016**, 5, 114.

14. Kumar, M.; Kumari, P.; Trivedi, N.; Shukla, M.K.; Gupta, V.; Reddy, C.R.K.; Jha, B. Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 797–810.
15. Khotimchenko, S.V.; Kulikova, I.V. Lipids of two species of brown algae of the genus *Laminaria*. *Chem. Nat. Compd.* **1999**, *35*, 17–20.
16. Holdt, S.L.; Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 543–597.
17. Kumari, P.; Kumar, M.; Reddy, C.R.K.; Jha, B. 3 - Algal lipids, fatty acids and sterols. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2013; pp. 87–134 ISBN 978-0-85709-512-1.
18. Pérez, M.J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Mar. Drugs* **2016**, *14*.
19. Dembitsky, V.M.; Rozentsvet, O.A. Phospholipid composition of some marine red algae. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3149–3152.
20. Polat, S.; Ozogul, Y. Seasonal proximate and fatty acid variations of some seaweeds from the northeastern Mediterranean coast. *Oceanologia* **2013**, *55*, 375–391.
21. Heiba, H.I. Fatty acid composition of eleven algae from coastal zones of Qatar. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1989**, *39*, 401–405.
22. Aknin, M.; Miralles, J.; Kornprobst, J.-M. Sterol and fatty acid distribution in red algae from the senegalese coast. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **1990**, *96*, 559–563.
23. Li, X.; Fan, X.; Han, L.; Lou, Q. Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 157–161.
24. Khotimchenko, S.V. Distribution of Glyceroglycolipids in Marine Algae and Grasses. *Chem. Nat. Compd.* **2002**, *38*, 223–229.
25. Tasende, M.G. Fatty acid and sterol composition of gametophytes and sporophytes of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyta). *Sci. Mar.* **2000**, *64*, 421–426.
26. Khotimchenko, S.V.; Vaskovsky, V.E.; Titlyanova, T.V. Fatty Acids of Marine Algae from the Pacific Coast of North California. *Bot. Mar.* **2005**, *45*, 17–22.
27. Khotimchenko, S.V. Lipids from the Marine Alga *Gracilaria verrucosa*. *Chem. Nat. Compd.* **2005**, *41*, 285–288.
28. Penna Lisboa, B.; Ganschow, I.; Halket, J.; Pinheirojoventino, F. The Trace Sterols of the Red Alga *Laurencia papillosa* Investigated by Open Tubular Capillary Column Chromatography-Mass

Spectrometry. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. - COMP BIOCHEM PHYSIOL B BIOCHEM MOL BIOL **1982**, 73, 257–264.

29. Al Easa, H.S.; Kornprobst, J.-M.; Rizk, A.M. Major sterol composition of some algae from Qatar. Phytochemistry **1995**, 39, 373–374.

30. Gibbons, G.F.; Goad, L.J.; Goodwin, T.W. The sterols of some marine red algae. Phytochemistry **1967**, 6, 677–683.

31. Fattorusso, E.; Magno, S.; Santacroce, C.; Sica, D.; Impellizzeri, G.; Mangiafico, S.; Oriente, G.; Piattelli, M.; Sciuto, S. Sterols of some red algae. Phytochemistry **1975**, 14, 1579–1582.

32. Patterson, G.W. The distribution of sterols in algae. Lipids **1971**, 6, 120–127.

3. Conclusion

Ce travail de thèse a permis pour la première fois d'étudier la composition en lipides de la macroalgue marine rouge *Laurencia papillosa*, une espèce peu étudiée de la côte libanaise.

En ce qui concerne l'extraction et la séparation des lipides en classes, la teneur en lipides totaux contenue dans *L. papillosa* était faible de 0,74% de la matière sèche, ce qui en accord avec la littérature (< 6% de la matière sèche), et les glycolipides représentaient la principale classe de lipides.

En ce qui concerne la composition en acides gras, nos résultats concordent avec ce qui a été décrit dans la littérature : les macroalgues rouges se caractérisent par un taux très élevé d'AGS, l'acide palmitique étant le principal, la présence de l'acide oléique comme l'un des acides gras les plus abondants parmi les AGMI et une teneur élevée en AGPI C20 principalement l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque.

En outre, les résultats de l'analyse de la fraction insaponifiable de lipides neutres étaient cohérents avec ceux d'autres publications selon lesquelles les stérols C27 sont les plus détectés chez les macroalgues rouges, le cholestérol étant dominant.

La teneur en lipides et la composition en acides gras et en stérols peuvent varier pour les mêmes espèces d'algues en fonction des conditions environnementales (Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016), il serait donc important d'examiner les effets des variations saisonnières et géographiques sur la composition lipidique de *L. papillosa*.

Par ailleurs, la fraction des glycolipides présentait l'activité cytotoxique la plus élevée sur les cellules cancéreuses du sein MCF-7. Il serait intéressant de la purifier pour identifier le(s) composé(s) responsable(s) de cette activité biologique.

Chapitre IV. Cytotoxicité du cholest-4-èn-3-one, un nouvel agoniste de LXR, dans les cellules du cancer du sein

1. Contexte de l'étude

Comme mentionné ci-dessus, le cholest-4-èn-3-one a été identifié dans la fraction acétonique bioactive issue du fractionnement à petite échelle de *Laurencia papillosa*. En fait, des travaux récents ont montré un effet anticancéreux intéressant de ce métabolite dans les lignées cellulaires de l'adénocarcinome pulmonaire humain A549 et SPC-A-1 (Ma *et al.* 2016). Nous avons alors émis l'hypothèse que ce dérivé de cholestérol pourrait participer à l'activité biologique de notre fraction. Nous nous sommes donc procuré du cholest-4-èn-3-one afin d'étudier ses effets sur la lipogenèse, la biosynthèse du cholestérol et l'intégrité des radeaux lipidiques dans deux lignées cellulaires du cancer du sein, MCF-7 et MDA-MB-231 (Figure 55). Nous avons également examiné sa capacité à inhiber la croissance et la migration cellulaire.

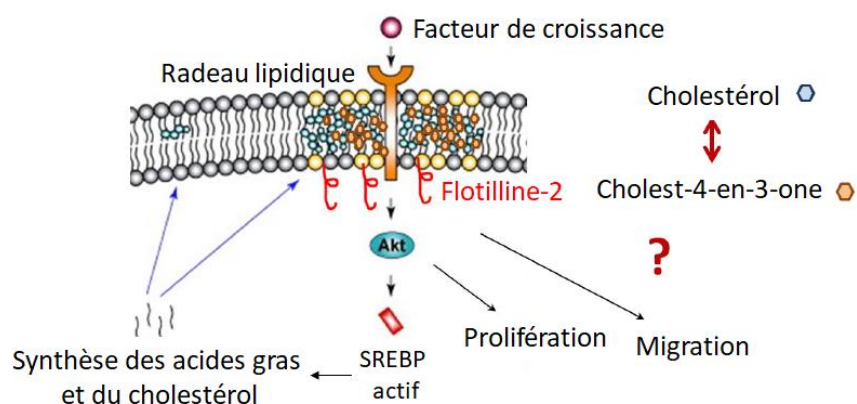


Figure 55. Schéma montrant les différents objectifs de la présente étude, modifié d'après (Krycer *et al.* 2010)

Nos résultats font l'objet d'une publication soumise dans le journal « Cellular Oncology » le 21/12/2018.

2. Présentation de la publication

4-cholesten-3-one is an LXR agonist that decreases breast cancer cell growth by reducing lipogenesis and membrane raft-localized EGFR and enhancing transporter-induced cholesterol efflux

**Josiane Elia¹, Delphine Carbonnelle¹, Jean-Michel Huvelin¹, Alexandra Burghilea¹, Mona Tannoury²,
Mona Diab-Assaf², Karina Petit¹, Hassan Nazih^{1*}**

¹ Faculty of Pharmaceutical and Biological Sciences, University of Nantes, “Mer Molécules Santé”, EA 2160, EA 2160, 9 Rue Bias, BP 53508, F-44035 Nantes Cedex 1, France; ² Faculty of Science II, EDST, Lebanese University, Fanar, Lebanon

* Correspondence: el-hassane.nazih@univ-nantes.fr

Abstract

Background/Aim The alteration of lipid metabolism in cancer cells is recognized as one of the most important metabolic hallmarks of cancer. Membrane rafts defined as plasma membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids serve as platforms for signaling regulation in cancer. The main purpose of this study was to evaluate the effect of the cholesterol metabolite, 4-cholesten-3-one, on lipid metabolism and membrane raft integrity in two breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. Its ability to inhibit cell growth and migration has also been investigated. *Methods* RT-qPCR was performed to evaluate the expression of enzymes involved in lipogenesis and cholesterol synthesis, and ABCG1 and ABCA1 transporters involved in cholesterol efflux. The effect of 4-cholesten-3-one on membrane rafts integrity was investigated by studying the protein expression of flotillin-2, a membrane raft marker, and raft-enriched EGFR by western blot. Its effect on cell growth and migration was studied using the MTT assay and the wound healing assay, respectively. *Results* Interestingly, we found that 4-cholesten-3-one treatment decreased mRNA expression of different enzymes including ACC1, FASN, SCD1 and HMGCR. We further demonstrated that 4-cholesten-3-one increased the expression of ABCG1 and ABCA1. We also found that 4-cholesten-3-one disrupts membrane rafts and signaling pathways by decreasing the protein expression of flotillin-2 and EGFR in membrane raft fractions. As a result, inhibition of cell growth and migration capacity was observed. *Conclusion* Our results show that 4-cholesten-3-one exerts LXR agonist activity in breast cancer cells without increasing lipogenesis.

Keywords 4-cholesten-3-one; breast cancer cells; lipogenesis; LXR; membrane raft; EGFR.

1 Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death among women [1]. An estimated 2.1 million new cases of cancer and 627 000 deaths from breast cancer occurred in 2018 worldwide [2].

Cancer is typically characterized by abnormal and uncontrolled cell proliferation, resistance to apoptosis, cell migration, and other key features. On top of this, deregulation of lipid metabolism is known to be one of the emerging metabolic hallmarks of cancer cells [3]. It is known that rapidly proliferating cancer cells require a large amount of lipids for cell membrane synthesis and an increased need for energy [4]. To meet their lipid requirements, cancer cells exhibit increased lipogenesis (also known as synthesis of *de novo* fatty acids) [5]. Briefly, lipogenesis is initiated by carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA catalyzed by ACC (acetyl-CoA carboxylase) [6]. Then, FASN (fatty acid synthase) synthesizes palmitic acid from acetyl-CoA and malonyl-CoA. The desaturation of newly synthesized fatty acids is then catalyzed by SCD1 (stearoyl-CoA desaturase 1) which inserts a double bond in the $\Delta 9$ position of palmitic acid to produce monounsaturated fatty acids, palmitoleic acid. Another metabolic pathway of lipid metabolism is the mevalonate pathway, which synthesizes cholesterol [7]. HMGCR (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase) is the rate-controlling enzyme of this pathway, it catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevalonic acid, a necessary step in the biosynthesis of cholesterol [7]. It has been shown that the enzymes involved in lipogenesis and cholesterol biosynthesis are highly expressed in various cancer cells, such as breast and prostate cancer cells, and have recently been reported as a target for cancer treatment [6,8].

The liver X receptor (LXR) is a transcription factor of the nuclear receptor superfamily that forms heterodimers with the retinoid X receptor (RXR) and can be activated with a natural or synthetic agonist. LXR α is expressed in all metabolically active tissues such as liver, adipose tissue, kidneys, intestine and macrophage, whereas LXR β is expressed ubiquitously. Activated LXR regulates the expression of genes involved in lipogenesis such as ACC1, FASN, SCD1 and SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c) and in cholesterol efflux, the first step of the reverse transport of cholesterol from macrophage to liver, such as ABCG1 (ATP-binding cassette sub-family G member 1), ABCA1 (ATP-binding cassette sub-family A member 1) and APOE (apolipoprotein E) [9,10]. Recent studies have demonstrated the antiproliferative effect of LXR agonists in various types of cancers such as leukemia, prostate, breast, ovarian and colon cancers [11]. It has been reported that activation of LXR deprives MCF-7 breast cancer cell membranes of cholesterol essential for their growth by stimulating its efflux via ABCG1, resulting in inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis [12].

Cholesterol is an important component of membrane rafts which are microdomains of the plasma membrane. These microdomains serve as membrane platforms for signaling molecules that are involved in a variety of cellular functions including cell growth, survival and migration, such as epidermal growth factor receptors (EGFRs) which are overexpressed in many cancer types such as breast and colon cancers [13,14]. Therefore, it has been suggested that membrane rafts play a functional role during tumorigenesis [15]. Flotillin-2 is identified as a major protein on microdomain membrane rafts. Its expression has been shown to be upregulated in various cancer cells, including breast cancer cells, suggesting its involvement in carcinogenesis [16,17]. In addition, it has been reported that its downregulation is associated with the inhibition of cancer cell proliferation, migration and invasion [18]. In the gastrointestinal tract, cholesterol is metabolized to 4-cholesten-3-one (Fig. 1) by cholesterol oxidase [19]. This cholesterol derivative is identified in bile, blood, gallstones and human faeces [20,21]. It can also be found in marine algae [22,23], marine fish [24] and plant roots [25]. It should be noted that it was also identified by our team in an extract of a red marine alga *Laurencia papillosa* collected from the Lebanese coast (data not yet published). 4-cholesten-3-one exerts various biological activities such as antitumor (inhibition of cancer cell growth, suppression of metastases, inhibition of beta transforming growth factor signaling) [19,26,27], anti-obesity on mice (inhibition of body fat accumulation, maintenance of normal body weight) [28] anti-leishmaniasis [25], and an inhibitory activity on the enzyme beta-secretase 1, a target in Alzheimer physiopathology [24].

In this study, we investigated whether 4-cholesten-3-one influences lipogenesis and cholesterol biosynthesis in two breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. We also examined the effect of 4-cholesten-3-one on the integrity of membrane rafts to determine whether targeting of lipid metabolism can disrupt membrane rafts in cancer cells. Its ability to inhibit cell growth and migration has also been studied.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Two human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231, and human monocyte THP-1 cells were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, United Kingdom). 4-cholesten-3-one, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT), fetal bovine serum, penicillin-streptomycin, trypsin, glutamine, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol (EtOH), bovine serum albumin (BSA), primers for qPCR, triton X-100, OptiPrep™ Density

Gradient Medium, SR9238, and antibodies against beta-actin and EGFR were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent, and Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail were obtained from Life Technologies (Saint-Aubin, France). TRIzol reagent for RNA isolation was from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR and iQ™ SYBR Green Supermix were purchased from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Antibody against flotillin-2 were obtained from Abcam (Paris, France). The IRDye whole IgG secondary antibodies, IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG (H + L) and IRDye® 800CW Donkey anti-Mouse IgG (H + L), were purchased from LI-COR Biosciences (Bad Homburg, Germany).

2.2 Cell line and culture

Breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231) and THP-1 cells were cultured in DMEM and RPMI 1640 respectively, both supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine and 1% penicillin-streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.3 Cell treatment

4-cholesten-3-one was dissolved in absolute ethanol to obtain a stock solution of 100 mM. For the treatment of cultured cells, the stock solution was diluted to the required concentration with a serum-free medium containing 0.1% BSA. The control cells were incubated with 0.2% EtOH.

2.4 RNA extraction and real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR)

Breast cancer cells were seeded at a density of 5x10⁵ cells/well in a 6-well plate and left to adhere overnight. THP-1 cells were plated at a density of 10⁶ cells/well in a 6-well plate and were allowed to differentiate into macrophage with 100 nM PMA for 24 h. Then the culture medium was removed and the cells were treated for 24 h at 37°C. Total RNA was extracted from cultured cells using TriZol Reagent according to the manufacturer's recommendations. The concentration of the extracted RNA was determined by measuring the 260/280 absorbance with the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. 1 µg of total RNA was then reverse-transcribed into complementary DNA using iScript Reverse Transcription Supermix by following the manufacturer's protocol. An initial priming step of 5 min at 25°C was followed by a reverse transcription of 30 min at 42°C and a reverse transcription inactivation step of 5 min at 85°C. After cDNA synthesis, quantitative PCR was performed on a MyiQ2 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using an iQ™ SYBR Green Supermix. The cycling conditions were 95°C for

30 s and 60°C for 30 s for 45 cycles. The mRNA expression of FASN, ACC1, SCD1, HMGCR, ABCG1, ABCA1, LXR, APOE and 18S a housekeeping gene used as an internal control, was determined. The gene expression was normalized to the housekeeping gene using the $2^{\Delta\Delta CT}$ method. The primer sequences used are shown in Table 1.

2.5 Biochemical membrane raft isolation

The isolation of the membrane rafts was carried out as previously described by [29]. The breast cancer cells were plated at 2×10^6 cells, incubated at 37°C overnight and then treated with 4-cholesten-3-one at 50 μ M for 48 h for MCF-7, and at 25 μ M for 24 h for MDA-MB-231. Following incubation at 37°C, the cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with 1 mL of lysis media containing 1% triton X-100 per condition. Next, the lysed cells (0.84 mL) were purified using an OptiPrep™ density gradient (35% (w/v), 1.16 mL) and placed in the bottom of a 10 mL ultracentrifuge tube. A discontinuous density gradient was then prepared by overlaying the three OptiPrep™ gradients (2 mL for each of the following gradients 30, 25 and 20%). The upper gradient layer consisted of 1 mL lysis buffer. Samples were centrifuged at $200,000 \times g$ for 4 h at 4°C in a Beckman L8-70M Ultracentrifuge, using TFT 65.13 rotor. Nine 1 mL fractions were collected from top to bottom of the gradient for each condition and then analyzed by western blot. The fractions corresponding to the membrane rafts are fractions 2, 3 and 4 isolated from MCF-7 cells and fractions 3, 4 and 5 isolated from MDA-MB-231 cells.

2.6 Protein extraction

MDA-MB-231 cells were grown in a 6-well plate at a density of 5×10^5 cells/well and treated with 75 μ M 4-cholesten-3-one for 24 and 48 h. Total proteins were extracted with lysis buffer composed of M-PER, protease and phosphatase inhibitors. The protein concentration was determined using the Bicinchoninic Acid Protein Assay.

2.7 Western blot analysis

Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 5% skim milk in Tris buffered saline containing 0.1% Tween at room temperature for 2 h and then incubated at 4°C overnight with primary antibodies against flotillin-2 (1/500), EGFR (1/1500) and beta-actin, a loading control (1/2000). Subsequently, the membrane was washed and incubated with IRDye whole IgG secondary antibodies

(1/15000) at room temperature for 2 h. Finally, proteins bands were visualized using a B446 - LI-COR Odyssey® Infrared Imaging System.

2.8 MTT assay

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were plated at a density of 10^4 cells/well in a 96-well plate and grown for 24 h. Thereafter, the cells were treated for 24 and 48 h at various concentrations of 4-cholesten-3-one (6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 μ M). The effect of 4-cholesten-3-one on cell growth was examined using the MTT assay. After 24 and 48 h of treatment, 50 μ L of MTT solution (2.5 mg/mL) was added to each well followed by 4 h of incubation at 37°C. Then, the medium was removed and the formazan crystals were dissolved in 200 μ L of DMSO. Finally, the absorbance was measured at 570 nm using a SpectraMax 190 microplate reader.

2.9 Scratch wound healing assay

The scratch assay was performed to assess cell migration *in vitro*. MDA-MB-231 cells were seeded in a 6-well plate at a density of 10^6 cells/well. When the cells reached confluency, a linear scratch wound was created in the middle of the confluent monolayer using a sterile 200 μ L pipette tip. The culture medium was then removed and replaced with fresh medium supplemented with 75 μ M 4-cholesten-3-one or 0.2% EtOH as a control. The scratched area was captured at 0 and 48 h after scratching using an Olympus Inverted Phase Contrast Microscope with a 10X phase objective.

2.10 Data analysis

Data represent mean values \pm standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. The Student's t-test was used and the p-value <0.05 was considered significantly different from the corresponding control.

3 Results

3.1 4-cholesten-3-one reduces lipogenesis and cholesterol biosynthesis in breast cancer cells

Firstly, we determined whether treatment with 4-cholesten-3-one reduced lipogenesis and cholesterol biosynthesis in breast cancer cells. We therefore examined the mRNA expression of enzymes involved in these two pathways in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated or not treated with 50 μ M 4-cholesten-3-one for 24 h. Compared with the control group set to 1, quantitative PCR results showed that 4-cholesten-3-one decreased the mRNA expression of the key lipogenic enzymes ACC1 (0.56 in MCF-7 and

0.47 in MDA-MB-231) and FASN (0.31 in MCF-7 and 0.23 in MDA-MB-231) (Fig. 2). The mRNA expression of SCD1 (0.51 in MCF-7 and 0.40 in MDA-MB-231), a key enzyme involved in the synthesis of monounsaturated fatty acids and HMGCR (0.50 in MCF-7 and 0.15 in MDA-MB-231), a rate-limiting enzyme for cholesterol synthesis, was also decreased in treated cells compared to untreated cells (Fig. 2).

3.2 4-cholesten-3-one increases the expression of ABCG1 and ABCA1 transporters in breast cancer cells

RT-qPCR was then performed to examine the effect of 4-cholesten-3-one on the expression of ABC transporters, including ABCG1 and ABCA1. After 24 h of treatment, 12.5 μ M 4-cholesten-3-one increased the mRNA expression of ABCG1 (1.50) in MCF-7 cells, and ABCG1 (4.46) and ABCA1 (3.86) in MDA-MB-231 cells compared to untreated cells (Fig. 3).

3.3 Upregulation of ABCG1 and ABCA1 by 4-cholesten-3-one is suppressed by the LXR inverse agonist in breast cancer cells

To determine whether the increase in ABCG1 and ABCA1 expression induced by 4-cholesten-3-one was LXR-dependent, we decided to suppress LXR activity in breast cancer cells using an SR9238 inverse agonist and to subsequently study the mRNA expression of LXR target genes, ABC transporters. In MCF-7 cells, the mRNA expression of ABCG1 was significantly reduced to 0.08 when the cells were treated with SR9238 alone (12.5 μ M) and to 0.11 after treatment with SR9238 (12.5 μ M) and 4-cholesten-3-one (12.5 μ M) together compared to untreated control cells after 24 h (Fig. 3). In MDA-MB-231 cells, SR9238 alone and the combination of SR9238 and 4-cholesten-3-one completely abolished the expression of ABCG1 and ABCA1 (Fig. 3).

3.4 4-cholesten-3-one increases mRNA expression of LXR and its target genes in THP-1 cells

The monocytic cell line THP-1 is frequently used as a macrophage cell model. Here, we tested the effect of 4-cholesten-3-one on the expression of LXR and its target genes. Treatment of macrophage-differentiated THP-1 cells with 12.5 μ M 4-cholesten-3-one results in a remarkable increase in the mRNA expression of LXR (20.08) as well as its target genes ABCA1 (2.92), ABCG1 (5.59) and APOE (6.34) after 24 h compared to untreated cells (Fig. 4).

3.5 4-cholesten-3-one disrupts membrane rafts of breast cancer cells

To evaluate the effect of 4-cholesten-3-one on the membrane rafts of breast cancer cells, we first studied the protein expression of flotillin-2, a membrane raft marker. Western blot analysis showed that treatment with 4-cholesten-3-one resulted in decreased expression of flotillin-2 in fractions corresponding to membrane rafts (Fig. 5). We also observed a decrease in the level of EGFR protein in membrane raft fractions isolated from MDA-MB-231 cells treated with 4-cholesten-3-one as compared with those of untreated cells.

Interestingly, we found that EGFR expression did not change in whole cell lysates after 24 and 48 h of MDA-MB-231 treatment with 75 μ M 4-cholesten-3-one (Fig. 6).

3.6 4-cholesten-3-one reduces the growth of breast cancer cells

We then evaluated the effect of 4-cholesten-3-one on the growth of breast cancer cells. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with increasing concentrations (6.25 - 200 μ M) for 24 and 48 h and cell growth was measured by MTT assay. As shown in Fig. 7, 4-cholesten-3-one reduced MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cell growth in a dose-and time-dependent manner. The IC_{50} value was 17.8 and 14.1 μ M after 48 h of treatment for MCF-7 and MDA-MB-231 cells respectively.

3.7 Reduction of breast cancer cell growth by 4-cholesten-3-one is reduced by the LXR inverse agonist

SR9238 (12.5 μ M) alone stimulated remarkably cell growth in MCF-7 cells after 24 and 48 h. As shown in Fig. 8, exposure of MCF-7 cells to 4-cholesten-3-one (6.25 μ M) and SR9238 (12.5 μ M) together resulted in decreased inhibition of cell growth compared to that obtained after treatment with 4-cholesten-3-one alone (6.25 μ M). The results are unconvincing for MDA-MB-231 cells that were highly sensitive to 4-cholesten-3-one and less sensitive to SR9238 from the point of view of cell growth (data not shown).

3.8 4-cholesten-3-one reduces MDA-MB-231 breast cancer cell migration

We next examined the effect of 4-cholesten-3-one at 75 μ M on MDA-MB-231 cell migration after 48 h of treatment using scratch wound healing assay. Cells without treatment progressively reduced the width of the wound, a small sign of wound was observed after 48 h (Fig. 9a). Compared to cells in the control group, MDA-MB-231 cells exhibited reduced migration after treatment with 4-cholesten-3-one, the percentage of covered scratch was 23.4% after 48 h and the wound was not completely closed (Fig. 9a and b).

4 Discussion

4-cholesten-3-one results from the oxidation of cholesterol by cholesterol oxidase in the gastrointestinal tract [19]. It is found in bile, human gallstones and faeces [20,21] and can also be identified in plant and animal tissues [22–25]. Recent work has shown that this intestinal cholesterol metabolite exhibits inhibitory activity of *in vitro* migration and metastasis *in vivo* in human lung adenocarcinoma cell lines [27], as well as inhibitory activity of transforming growth factor beta signaling in colorectal cancer cell line [19]. In this study, we sought to evaluate whether 4-cholesten-3-one exerts a cytotoxic effect on breast cancer cells while reducing lipogenesis and cholesterol biosynthesis and altering membrane rafts. Increased lipogenesis is recognized as a hallmark of cancer. It is suggested that this process is necessary for cancer cell proliferation and survival [30,31]. An upregulation of the enzymes involved in this pathway, such as ACC, FASN and SCD1, has been observed in various types of cancer (breast, prostate, ...), and their inhibition in cancer cells leads to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis [30–34]. These lipogenic enzymes are therefore considered potential targets for cancer therapy. Since fatty acids are essential for cancer cell growth, we sought to evaluate the impact of 4-cholesten-3-one on the lipogenesis in breast cancer cell lines. We first examined the mRNA expression of the lipogenic enzymes in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Our results showed that 4-cholesten-3-one decreased the expression of ACC1, FASN and SCD1, indicating that 4-cholesten-3-one can reduce lipogenesis in breast cancer cells. According to the literature, Chajès *et al.* [35] showed that silencing ACC and FASN genes in breast cancer cells resulted in a decrease in lipogenesis, leading to an apoptosis induction. Likewise, several studies have indicated that knockdown of ACC with siRNA induces apoptosis in prostate and breast cancer cells [30]. Moreover, breast cancer cells overexpressing FASN have been shown to induce apoptosis when treated with FASN inhibitors (C75, cerulenin) or with FASN siRNAs [36]. Minville-Walz *et al.* [37] showed that inhibition of SCD1 expression caused cell death in U2OS (osteosarcoma), SW480 (colorectal) and HCT116 (colon) human cancer cell lines by induction of caspase-3 activity and PARP-cleavage. A recent study by Zhao *et al.* [38] shows that MF-438, an inhibitor of SCD1, inhibits the proliferation of MCF-7 breast cancer cells, induces apoptosis and cell cycle arrest and decreases cell migration. Our results are consistent with the recently published article that shows that lithocholic acid, a cholesterol metabolite produced by intestinal bacteria, reduces lipogenesis and exhibits antiproliferative and pro-apoptotic effects in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines [39].

High levels of intracellular cholesterol have been detected in cancers compared to normal tissues, particularly following the abnormal activation of the cholesterol synthesis pathway [40]. HMGCR, a rate-

limiting enzyme essential for cholesterol synthesis, is upregulated in various types of cancer cells, including breast cancer cells, and plays an important role in cancer development [13]. Sánchez *et al.* [41] highlighted the antiproliferative effect of HMGCR inhibitors atorvastatin, fluvastatin and simvastatin on MCF-7 breast cancer cells; This effect was associated with a decrease in DNA synthesis and cell cycle arrest in the G1 and G2/M phases. A recent study of Ishikawa *et al.* [42] has shown that HMGCR inhibitor statin inhibits the proliferation and migration of cancer cells, as well as the formation of metastases. The effect of 4-cholesten-3-one on HMGCR expression was examined in MCF-7 and MDA-MB-231 cells and a decrease in mRNA expression was observed, suggesting that cholesterol synthesis was downregulated in our cell models treated with 4-cholesten-3-one. High cholesterol levels can also be explained by downregulation of ABC transporters, such as ABCG1 and ABCA1 [40]. This prompted us to study the expression of the genes involved in the efflux of cholesterol, ABCG1 and ABCA1, after treatment with 4-cholesten-3-one. The breast cancer cells treated had a high expression level of these two ABC transporters after 24 h of treatment.

The liver X receptor (LXR), belonging to the nuclear receptor subfamily, plays a crucial role in the regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism. Since ABCA1 and ABCG1 were reported to be under positive control of LXR, we decided to investigate whether the increase in transporter expression by 4-cholesten-3-one was dependent on LXR. The results showed that following treatment of breast cancer cells with 4-cholesten-3-one and SR9238 an LXR inverse agonist together, the mRNA expression of ABCG1 and ABCA1 was suppressed, suggesting that the effect of 4-cholesten-3-one on ABC transporters expression is dependent on LXR in MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

THP1 cells are widely used as a model for studying cholesterol efflux and the expression of LXR and its target genes. In order to confirm the results obtained on the expression of ABC transporters in breast cancer cells and whether 4-cholesten-3-one is an LXR agonist, macrophage-differentiated THP-1 cells were used. LXR expression was markedly increased in macrophage-differentiated THP-1 cells treated with 4-cholesten-3-one compared to control cells. The expression of the LXR target genes involved in the efflux of cholesterol ABCA1, ABCG1 and APOE, was also increased by 4-cholesten-3-one in THP-1 macrophages. These results indicate that 4-cholesten-3-one can act as an activator of LXR.

Recent studies have demonstrated the antiproliferative role of LXR agonists in various cancer cell lines (prostate, breast, ovary, colon, leukemia) [11,43]. In this study, we evaluated the effect of 4-cholesten-3-one, alone or in combination with SR9238, on the growth of breast cancer cells using the MTT assay. The MTT assay showed that SR9238 stimulated cancer cell growth, particularly in MCF-7 cells. After treatment of these cells with 4-cholesten-3-one and SR9238 together, we noticed a decrease in the

percentage inhibition of cell growth, demonstrating that the cytotoxic effect of 4-cholesten-3-one on MCF-7 cells may be dependent on LXR activation. Surprisingly, we did not observe an increase in MDA-MB-231 cell growth by SR9238 at the dose tested, suggesting that this breast cancer cell line is more resistant to LXR regulation than MCF-7 cell line.

LXR agonists such as T0901317 have been shown to decrease cell proliferation, increase expression of ABC transporters but also increase lipogenesis and levels of triacylglycerol in plasma and liver. For this reason, they have proven unsuitable for clinical trials [44]. However, in this study, we found that 4-cholesten-3-one acts as an LXR agonist, in particular by increasing the expression of ABC transporters, decreasing cancer cell growth. Interestingly, it significantly reduces lipogenesis.

The decrease in membrane cholesterol and the increased expression of ABCG1 and ABCA1 involved in cholesterol efflux could disrupt membrane rafts. These latter are described as detergent-resistant microdomains of the cell membrane enriched in sphingolipid and cholesterol and are involved in various cellular functions, including cell survival, proliferation and migration, which play an important role in cancer development and progression [13,45]. Flotillin-2 is one of the membrane raft markers involved in cancer progression [16]. It has been discovered that flotillin-2 is significantly overexpressed in breast cancer cell lines [16] and that, in contrast, its knockdown inhibits the proliferation of breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231) [46]. Moreover, a recent report of Carbonnelle *et al.* [47] showed that the LXR agonist, T0901317, which has been shown to have antiproliferative effect, alters the membrane rafts of MCF-7 cells as evidenced by the decreased expression of flotillin-2. We therefore studied flotillin-2 expression in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells treated or not with 4-cholesten-3-one. Western blotting performed following membrane raft isolation revealed reduced expression of flotillin-2 in the membrane raft fractions of the two treated breast cancer cells, attesting that 4-cholesten-3-one could disrupt the integrity of membrane rafts.

Plasma membrane microdomains are also known to organize transmembrane receptors such as EGFR a member of the receptor tyrosine kinase family that is overexpressed in many cancer types such as breast and colon cancers [13,14,48]. Membrane raft fractions were found to contain more protein levels of EGFR than non-membrane raft fractions in cancer cells, such as cervical, colon and breast cancer cells [48]. In addition, membrane rafts disruption has been shown to alter EGFR signaling that affects various cellular processes in many cancers, including cell proliferation, apoptosis inhibition, cell migration, angiogenesis and metastasis [49,50]. In this study, we found that treatment of MDA-MB-231 cells with 4-cholesten-3-one reduced EGFR expression in membrane microdomain fractions without altering EGFR expression in the whole cell lysate. It is known that EGFR is active especially when it is located in

membrane rafts. Our results are therefore particularly interesting and highlight the ability of 4-cholesten-3-one to disrupt membrane rafts as well as the signaling molecules enriched in these microdomains.

The reduction of lipogenesis and cholesterol synthesis and the alteration of the integrity of signaling platforms has various intracellular consequences on cancer cell growth and migration. To better understand 4-cholesten-3-one in breast cancer cells, an MTT assay was performed to evaluate cell growth. 4-cholesten-3-one exhibited a dose- and time-dependent cytotoxic effect on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells with an IC₅₀ value of 17.8 and 14.1 μ M respectively after 48 h. This result is consistent with another study reporting the cytotoxic activity of 4-cholesten-3-one on several human breast, prostate and colon cancer cell lines [26]. Moreover, we found that 4-cholesten-3-one decreased MDA-MB-231 breast cancer cell migration which is in agreement with an earlier study in which it inhibited the migration of human lung adenocarcinoma cell lines [27].

5 Conclusion

In conclusion, 4-cholesten-3-one is an original metabolite that acts as LXR agonists without their adverse effect (enhanced lipogenesis). In this study, we showed that 4-cholesten-3-one (1) reduces lipogenesis and cholesterol biosynthesis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells by reducing the mRNA expression of the enzymes involved in these two pathways, (2) increases the mRNA expression of the ABCG1 and ABCA1 transporters, and (3) disrupts membrane rafts, as evidenced by decreased expression of the flotillin-2 membrane raft marker and the EGFR signaling molecule. As a consequence of the reduction of lipogenesis and the synthesis of cholesterol as well as the disorganization of membrane rafts, 4-cholesten-3-one showed a decrease in breast cancer cell growth and a loss of migration capacity. With respect to its mechanism, it has been documented that 4-cholesten-3-one can replace membrane cholesterol [19,27]. However, regarding our results, we can consider that (4) 4-cholesten-3-one also likely enters the target cells and exerts LXR agonist activity.

Taking everything into account, this study suggests that breast cancer cell growth and migration could be regulated by lipid metabolism pathway and membrane raft integrity under the control of 4-cholesten-3-one. Together, we suggest a potential therapeutic role of 4-cholesten-3-one in breast cancer cells. Therefore, the nutritional intake of 4-cholesten-3-one or the induction of its production by intestinal bacteria could be a promising strategy for the prevention and / or treatment of breast cancer.

Acknowledgements We are grateful to The Islamic Center Association for Guidance and Higher Education for their valuable financial support (PhD grant to Josiane Elia).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 87–108 (2015)
2. WHO | Breast cancer, WHO. Online. Available: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>. Accessed: 22-Sep-2018.
3. Q. Liu, Q. Luo, A. Halim, G. Song, Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Lett.* **401**, 39–45 (2017)
4. F. Baenke, B. Peck, H. Miess, A. Schulze, Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis. Model. Mech.* **6**, 1353–1363 (2013)
5. C. Mounier, L. Bouraoui, E. Rassart, Lipogenesis in cancer progression (review). *Int. J. Oncol.* **45**, 485–492 (2014)
6. C. R. Santos, A. Schulze, Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* **279**, 2610–2623 (2012)
7. J. W. Clendening, A. Pandyra, P.C. Boutros, S. El Ghamrasni, F. Khosravi, G.A. Trentin, A. Martirosyan, A. Hakem, R. Hakem, I. Jurisica, L. Z. Penn, Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15051–15056 (2010)
8. Y. Chen, P. Li, Fatty acid metabolism and cancer development. *Sci. Bull.* **61**, 1473–1479 (2016)
9. K. H. Kim, G. Y. Lee, J. I. Kim, M. Ham, J. Won Lee, J. B. Kim, Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *J. Lipid Res.* **51**, 3425–3433 (2010)
10. C. A. Flaveny, K. Griffett, Bel-D. El-Gendy, M. Kazantzis, M. Sengupta, A.L. Amelio, A. Chatterjee, J. Walker, L. A. Solt, T. M. Kamenecka, T. P. Burris, Broad Anti-tumor Activity of a Small Molecule that Selectively Targets the Warburg Effect and Lipogenesis. *Cancer Cell* **28**, 42–56 (2015)
11. R. Komati, D. Spadoni, S. Zheng, J. Sridhar, K. E. Riley, G. Wang, Ligands of Therapeutic Utility for the Liver X Receptors. *Mol. Basel Switz.* **22** (2017)

12. A. E. Roz, J.-M. Bard, J.-M. Huvelin, H. Nazih, LXR Agonists and ABCG1-dependent Cholesterol Efflux in MCF-7 Breast Cancer Cells: Relation to Proliferation and Apoptosis. *Anticancer Res.*, **32**, 3007–3013 (2012)
13. F. Mollinedo, C. Gajate, Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 130–146 (2015)
14. M. Guéguinou, A. Gambade, R. Félix, A. Chantôme, Y. Fourbon, P. Bougnoux, G. Weber, M. Potier-Cartereau, C. Vandier, Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca²⁺ channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1848**, 2603–2620 (2015)
15. M. E. Irwin, K. L. Mueller, N. Bohin, Y. Ge, J. L. Boerner, Lipid raft localization of EGFR alters the response of cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J. Cell. Physiol.* **226**, 2316–2328 (2011)
16. X. Wang, Q. Yang, L. Guo, X. H. Li, X. H. Zhao, L. B. Song, H. X. Lin, Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival outcomes. *J. Transl. Med.* **11**, 190 (2013)
17. A. Banning, N. Kurrle, M. Meister, R. Tikkanen, Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Cancer. *Cells*, **3**, 129–149 (2014)
18. K. Cao, D. Xie, P. Cao, Q. Zou, C. Lu, S. Xiao, J. Zhou, X. Peng, SiRNA-mediated flotillin-2 (Flot2) downregulation inhibits cell proliferation, migration, and invasion in gastric carcinoma cells. *Oncol. Res.* **21**, 271–279 (2014)
19. C.-L. Chen, D. C. Wu, M. Y. Liu, M. W. Lin, H. T. Huang, Y. B. Huang, L. C. Chen, Y. Y. Chen, J. J. Chen, P. H. Yang, Y. C. Kao, P. Y. Chen, Cholest-4-en-3-one attenuates TGF- β responsiveness by inducing TGF- β receptors degradation in Mv1Lu cells and colorectal adenocarcinoma cells. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **37**, 189–199 (2017)
20. D. W. Seo, H.-S. Choi, S. P. Lee, R. Kuver, Oxysterols from human bile induce apoptosis of canine gallbladder epithelial cells in monolayer culture. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, 1247-1256 (2004)
21. A. M. Wolfreys, P. A. Hepburn, Safety evaluation of phytosterol esters. Part 7. Assessment of mutagenic activity of phytosterols, phytosterol esters and the cholesterol derivative, 4-cholesten-3-one. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **40**, 461–470 (2002)
22. W. M. Alarif, S. S. Al-Lihaibi, S. E. Ayyad, M. H. Abdel-Rhman, F. A. Badria, Laurene-type sesquiterpenes from the Red Sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumor-antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **55**, 462–466 (2012)

23. M. Kendel, G. Wielgosz-Collin, S. Bertrand, C. Roussakis, N. Bourgougnon, G. Bedoux, Lipid Composition, Fatty Acids and Sterols in the Seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): An Analysis from Nutritional, Chemotaxonomic, and Antiproliferative Activity Perspectives. *Mar. Drugs*, **13**, 5606–5628 (2015)
24. Y.-Z. Zhu, J.-W. Liu, X. Wang, I.-H. Jeong, Y.-J. Ahn, C.-J. Zhang, Anti-BACE1 and Antimicrobial Activities of Steroidal Compounds Isolated from Marine *Urechis unicinctus*. *Mar. Drugs*. **16** (2018)
25. L. Pan, C. M. Lezama-Davila, A. P. Isaac-Marquez, E. P. Calomeni, J. R. Fuchs, A. R. Satoskar, A. D. Kinghorn, Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry*. **82**, 128–135 (2012)
26. A.-S. Lin, S. Engel, B. A. Smith, C. R. Fairchild, W. Aalbersberg, M. E. Hay, J. Kubanek, Structure and Biological Evaluation of Novel Cytotoxic Sterol Glycosides from the Marine Red Alga *Peyssonnelia* sp. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 8264–8269 (2010)
27. J. Ma, G. Fu, J. Wu, S. Han, L. Zhang, M. Yang, Y. Yu, M. Zhang, Y. Lin, Y. Wang, 4-cholesten-3-one suppresses lung adenocarcinoma metastasis by regulating translocation of HMGB1, HIF1 α and Caveolin-1. *Cell Death Dis.* **7**, e2372 (2016)
28. K. Suzuki, Anti-obesity effect of cholest-4-en-3-one, an intestinal catabolite of cholesterol, on mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **39**, 537–543 (1993)
29. R. Rao Malla, H. Raghu, J. S. Rao, Regulation of NADPH oxidase (Nox2) by lipid rafts in breast carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **37**, 1483–1493 (2010)
30. E. Currie, A. Schulze, R. Zechner, T. C. Walther, R. V. Farese, Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab.* **18**, 153–161 (2013)
31. N. Zaidi, L. Lupien, N. B. Kuemmerle, W. B. Kinlaw, J. V. Swinnen, K. Smans, Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **52**, 585–589 (2013)
32. C. Wang, S. Rajput, K. Watabe, D.-F. Liao, D. Cao, Acetyl-CoA carboxylase-a as a novel target for cancer therapy. *Front. Biosci. Sch. Ed.* **2**, 515–526 (2010)
33. D.-X. Luo, D. J. Tong, S. Rajput, C. Wang, D. F. Liao, D. Cao, E. Maser, Targeting acetyl-CoA carboxylases: small molecular inhibitors and their therapeutic potential. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **7**, 168–184 (2012)
34. J. A. Menendez, R. Lupu, Fatty acid synthase regulates estrogen receptor- α signaling in breast cancer cells. *Oncogenesis*. **6**, e299 (2017)

35. V. Chajès, M. Cambot, K. Moreau, G. M. Lenoir, V. Joulin, Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res.* **66**, 5287–5294 (2006)
36. S. Yoon, M. Y. Lee, S. W. Park, J. S. Moon, Y. K. Koh, Y. H. Ahn, B. W. Park, K. S. Kim, Up-regulation of Acetyl-CoA Carboxylase α and Fatty Acid Synthase by Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 at the Translational Level in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 26122–26131 (2007)
37. M. Minville-Walz, A. S. Pierre, L. Pichon, S. Bellenger, C. Fèvre, J. Bellenger, C. Tessier, M. Narce, M. Rialland, Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Expression Induces CHOP-Dependent Cell Death in Human Cancer Cells. *PLoS ONE.* **5** (2010)
38. J. Zhao, Z. Zhi, C. Wang, H. Xing, G. Song, X. Yu, Y. Zhu, X. Wang, X. Zhang, Y. Di, Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. *Oncol. Rep.* **38**, 2105–2115 (2017)
39. T. H. Luu, J. M. Bard, D. Carbonnelle, C. Chaillou, J. M. Huvelin, C. Bobin-Dubigeon, H. Nazih, Lithocholic bile acid inhibits lipogenesis and induces apoptosis in breast cancer cells. *Cell. Oncol. Dordr.* **41**, 13–24 (2018)
40. B. Smith, H. Land, Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene. *Cell Rep.* **2**, 580–590 (2012)
41. C. A. Sánchez, E. Rodríguez, E. Varela, E. Zapata, A. Páez, F. A. Massó, L. F. Montaña, R. Lóopez-Marure, Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress. *Cancer Invest.* **26**, 698–707 (2008)
42. T. Ishikawa, Y. Z. Hosaka, C. Beckwitt, A. Wells, Z. N. Oltvai, K. Warita, Concomitant attenuation of HMG-CoA reductase expression potentiates the cancer cell growth-inhibitory effect of statins and expands their efficacy in tumor cells with epithelial characteristics. *Oncotarget.* **9**, 29304–29315 (2018)
43. A. El Roz, J.-M. Bard, S. Valin, J.-M. Huvelin, H. Nazih, Macrophage apolipoprotein E and proliferation of MCF-7 breast cancer cells: role of LXR. *Anticancer Res.* **33**, 3783–3789 (2013)
44. X. Ju, P. Huang, M. Chen, Q. Wang, Liver X receptors as potential targets for cancer therapeutics. *Oncol. Lett.* **14**, 7676–7680 (2017)
45. T. Murai, The Role of Lipid Rafts in Cancer Cell Adhesion and Migration. *Int. J. Cell Biol.* **2012** (2012)

46. G. Xie, J. Li, J. Chen, X. Tang, S. Wu, C. Liao, Knockdown of flotillin-2 impairs the proliferation of breast cancer cells through modulation of Akt/FOXO signaling. *Oncol. Rep.* **33**, 2285–2290 (2015)
47. D. Carbonnelle, T. H. Luu, C. Chaillou, J.-M. Huvelin, J.-M. Bard, H. Nazih, LXR Activation Down-regulates Lipid Raft Markers FLOT2 and DHHC5 in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* **37**, 4067–4073 (2017)
48. Z. Zhang, L. Wang, J. Du, Y. Li, H. Yang, C. Li, H. Li, H. Hu, Lipid raft localization of epidermal growth factor receptor alters matrix metalloproteinase-1 expression in SiHa cells via the MAPK/ERK signaling pathway. *Oncol. Lett.* **12**, 4991–4998 (2016)
49. H. F. Turk, R. Barhoumi, R. S. Chapkin, Alteration of EGFR Spatiotemporal Dynamics Suppresses Signal Transduction. *PLOS ONE.* **7**, e39682 (2012)
50. A. de Laurentiis, L. Donovan, A. Arcaro, Lipid Rafts and Caveolae in Signaling by Growth Factor Receptors. *Open Biochem. J.* **1** (2007)

Table 1 Primer sequences used in this study

Gene symbol	Gene name	Sequence (5'-3')
18S rRNA	18S ribosomal RNA	F- GATGCGGCGGCGTTATTCC R- CTCCTGGTGGTGCCCTTCC
ACC1	Acetyl-CoA Carboxylase 1	F- TCGCTTTGGGGAAATAAAGTG R- ACCACCTACGGATAGACCGC
FASN	Fatty Acid Synthase	F- ACAGGGACAACCTGGAGTTCT R- CTGTGGTCCCCTTGATGAGT
SCD1	Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1	F- CAGAGGAGGTACTACAAACC R- ATAAGGACGATATCCGAAGAG
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A Reductase	F- TAACTCCTCCTTACTCGATAC R- AATAGATACACCACGCTCAT
ABCG1	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1	F- CAGGAAGATTAGACACTGTGG R- GAAAGGGGAATGGAGAGAAGA
ABCA1	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1	F- TCAGTGGGATGGATGGCAAAG R- TCCGACTCCGTCTGGCAATTA
LXR	Liver X Receptor	F- GCTCCCACCGCTGCTCTC R- TGCCCTTCTCAGTCTGTTCCAC
APOE	Apolipoprotein E	F- CTGCGTTGCTGGTCACATTCC R- CGCTCTGCCACTCGGTCTG

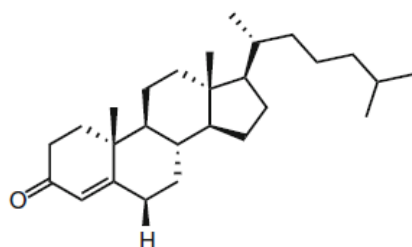


Fig. 1 Chemical structure of 4-cholesten-3-one

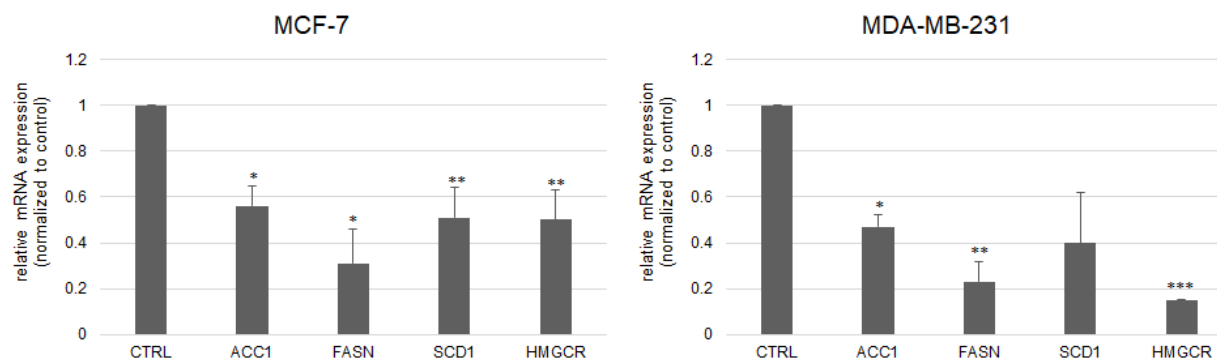


Fig. 2 Expression levels of genes coding for enzymes of the lipogenesis and cholesterol synthesis pathway in breast cancer cells. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated for 24 h with 4-cholesten-3-one at 50 μ M. Total RNA was isolated and the mRNA expression of ACC1, FASN, SCD1 and HMGCR was examined by RT-qPCR. The mRNA expression was normalized to 18S rRNA and the results are expressed relative to the control set at 1. The data represent the mean \pm the standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with control

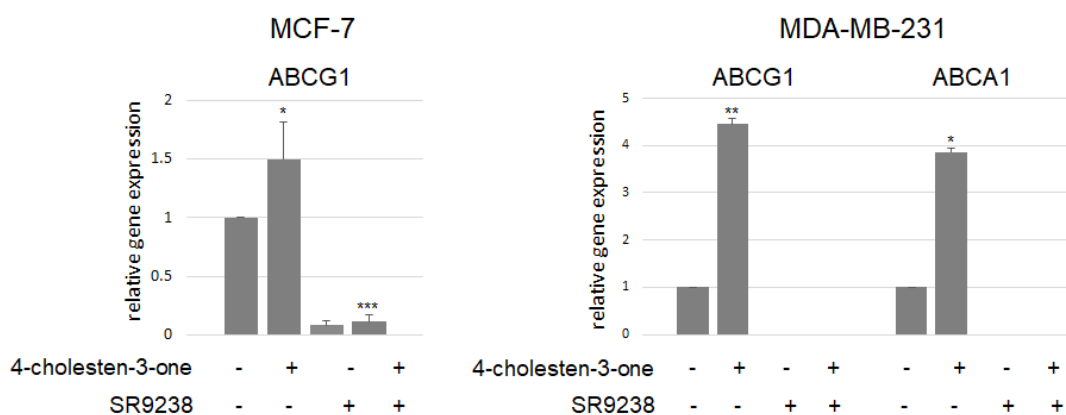


Fig. 3 Effect of 4-cholesten-3-one and SR9238 on ABCG1 and ABCA1 mRNA expression level in MCF-7 and MDA-MB-231 cells determined by quantitative PCR. The breast cancer cells were treated for 24 h with 12.5 μ M 4-cholesten-3-one alone, 12.5 μ M SR9238 alone, or 12.5 μ M 4-cholesten-3-one and 12.5 μ M SR9238 together. 18S rRNA was used as a housekeeping gene and the results are expressed with respect to the control defined at 1. All data were presented as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

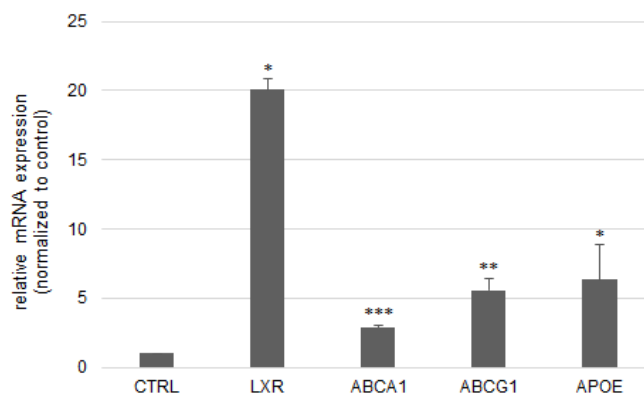


Fig. 4 Effect of 4-cholesten-3-one on the mRNA expression of LXR and its target genes in THP-1 macrophages. THP-1 human monocyte cells were first differentiated into macrophage-like cells by exposure to phorbol 12-myristate-13-acetate and then treated with 12.5 μ M 4-cholesten-3-one for 24 h. The mRNA expression was examined by real-time RT-PCR. 18S rRNA was used as a housekeeping gene. Results are expressed as the means \pm standard deviation. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

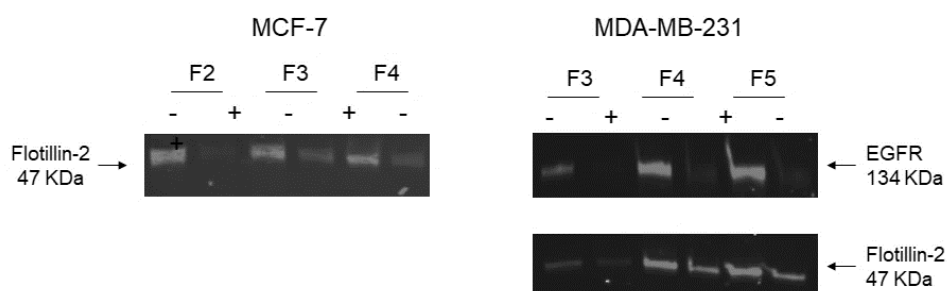


Fig. 5 Effect of 4-cholesten-3-one on the expression of flotillin-2 and EGFR in membrane raft fractions. Membrane rafts were isolated from MCF-7 and MDA-MB-231 cells as described in the Materials and Methods section. The membrane raft fractions were then collected, separated by SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-flotillin-2 and anti-EGFR antibodies. A representative western blot showing flotillin-2 and EGFR expression in cancer cells treated (+) or not treated (-) with 4-cholesten-3-one

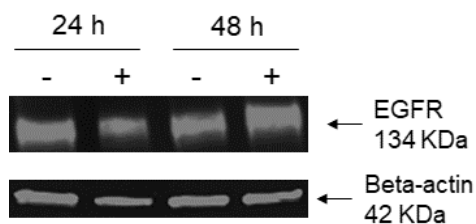


Fig. 6 Expression of EGFR protein in whole lysates of MDA-MB-231 cells after treatment with 4-cholesten-3-one. Cells were treated or not for 24 and 48 h with 75 μ M 4-cholesten-3-one. Western blot analysis was then performed to detect EGFR and beta-actin (loading control) in breast cancer cell lysates treated (+) or not treated (-)

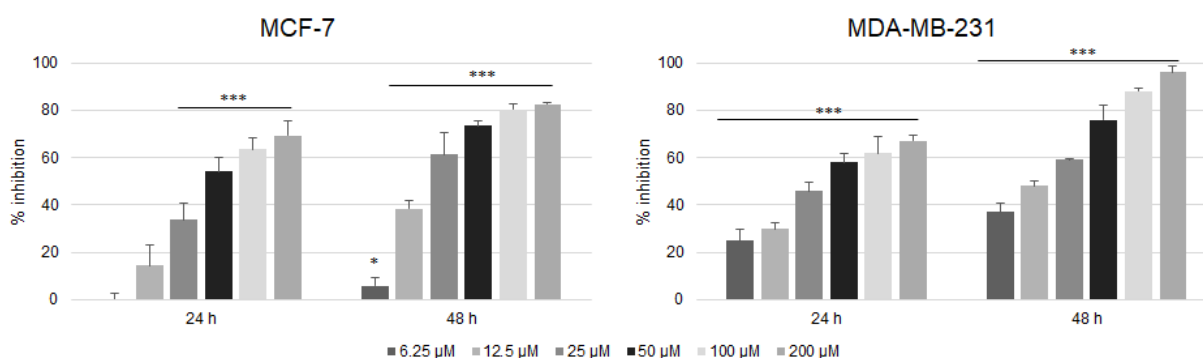


Fig. 7 Growth inhibition after exposure to 4-cholesten-3-one in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Cells were treated with the indicated concentrations of 4-cholesten-3-one for 24 and 48 h, and the cytotoxicity was determined by MTT assay. The data are represented as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed using t-test, * denote $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

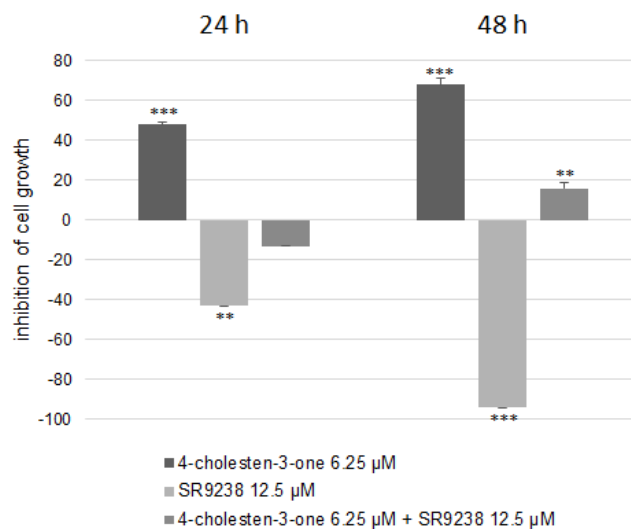


Fig. 8 Effect of 4-cholesten-3-one and SR9238 on cell growth in MCF-7 cells determined by MTT assay. The breast cancer cells were treated for 24 and 48 h with 6.25 µM 4-cholesten-3-one alone, 12.5 µM SR9238 alone, or 6.25 µM 4-cholesten-3-one and 12.5 µM SR9238 together. 18S rRNA was used as an internal control and the results are expressed with respect to the control defined at 1. All data were presented as mean ± standard deviation. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

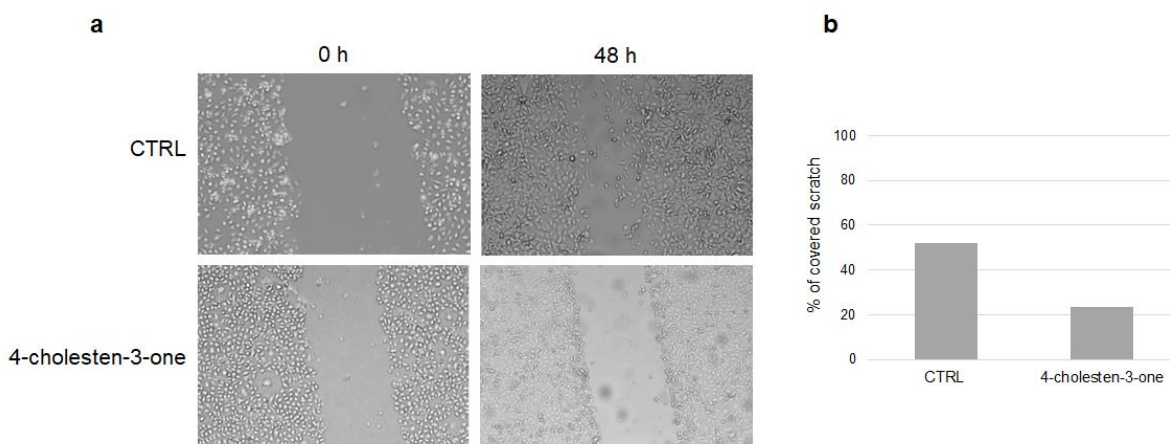


Fig. 9 Reduced cell migration in MDA-MB-231 cells following 4-cholesten-3-one treatment. The cells were scratched and then incubated with 75 µM 4-cholesten-3-one for 48 h. Images were captured after the indicated times. (A) Representative images of cell migration at 0 and 48 h from scratch wound healing assay performed in control and treated MDA-MB-231 cells. (B) The gap distance was quantitatively determined using MESURIM software after 48 h. The scratch width was measured as a percentage of the initial gap (the scratch width at 0 h was assumed to be 0% for both conditions)

3. Conclusion

Suite à un fractionnement bioguidé de *Laurencia papillosa*, le cholest-4-èn-3-one a été trouvé dans une fraction présentant des activités biologiques intéressantes dans les cellules cancéreuses du sein. Nous disposons des études basées sur l'hypothèse que ce dérivé du cholestérol pourrait participer aux activités biologiques observées (Ma *et al.* 2016). Le cholest-4-èn-3-one se trouve dans les tissus végétaux et animaux et est connu pour résulter de l'oxydation du cholestérol par la cholestérol oxydase dans le tractus gastro-intestinal (Alarif *et al.* 2012 ; Pan *et al.* 2012 ; Kendel *et al.* 2015 ; Chen *et al.* 2017 ; Zhu *et al.* 2018).

Les cellules cancéreuses prolifératives nécessitent un grand besoin d'énergie et d'éléments constitutifs cellulaires, tels que les lipides, et par conséquent présentent un métabolisme lipidique altéré, notamment une lipogénèse et une biosynthèse du cholestérol accrues (Santos and Schulze 2012 ; Baenke *et al.* 2013). Une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans ces deux voies a été observée dans les cellules cancéreuses, y compris les cellules cancéreuses du sein. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du cholest-4-èn-3-one sur la lipogénèse et la biosynthèse du cholestérol dans les cellules cancéreuses du sein humain MCF-7 et MDA-MB-231. Les résultats de la PCR quantitative ont montré une réduction de l'expression des enzymes de la lipogénèse (ACC1, FASN et SCD1) et de la biosynthèse du cholestérol (HMGCR).

Plusieurs études ont montré que la perte d'expression des transporteurs ABCG1 et ABCA1 contribue à l'accumulation aberrante de cholestérol intracellulaire dans les cellules cancéreuses. Nous nous sommes donc intéressés à étudier si le cholest-4-èn-3-one a un effet sur les transporteurs ABCG1 et ABCA1 impliqués dans l'efflux de cholestérol. Le traitement au cholest-4-èn-3-one a entraîné une augmentation de l'expression des transporteurs ABCG1 et ABCA1, stimulant ainsi l'efflux de cholestérol, ce qui prive la membrane des cellules cancéreuses d'un de ses constituants vitaux. Il a également été constaté que l'agoniste inverse de LXR, SR9238, diminue complètement l'expression d'ABCG1 et ABCA1, suggérant que l'augmentation de l'expression de ces transporteurs par cholest-4-èn-3-one dépend de LXR. Afin de confirmer les résultats obtenus sur l'expression de transporteurs ABC dans les cellules cancéreuses du sein, la lignée cellulaire humaine monocyttaire, THP-1, différenciée en macrophages a été utilisée. L'expression de LXR était augmentée, ainsi que celle de ses gènes cibles impliqués dans l'efflux de cholestérol, ABCA1, ABCG1 et APOE, dans les macrophages dérivés de THP-1. Ces résultats indiquent que le cholest-4-èn-3-one peut agir comme activateur de LXR. Plusieurs études ont montré que les agonistes de LXR réduisent la prolifération cellulaire, augmentent l'expression de transporteurs ABC

mais également la lipogenèse et les taux de triacylglycérols dans le plasma et le foie, pour cette raison, ils se sont révélés inappropriés pour les essais cliniques. Cependant, dans cette étude, nous avons constaté que le cholest-4-èn-3-one agit comme un agoniste de LXR : il augmentait l'expression des transporteurs ABC, diminuait la croissance des cellules cancéreuses et, plus intéressant encore, réduisait la lipogenèse.

Nous avons ensuite émis une autre hypothèse, à savoir qu'en augmentant l'expression de ABCG1 et ABCA1 impliqués dans l'efflux de cholestérol, le cholest-4-èn-3-one pourrait perturber les radeaux lipidiques. Ces derniers sont des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingolipides et servent de plateformes pour la régulation des voies de signalisation dans le cancer (Guéguinou *et al.* 2015 ; Mollinedo and Gajate 2015). Les résultats des essais biologiques ont montré que le cholest-4-èn-3-one réduit l'expression de la flotilline-2, attestant d'une perturbation de l'intégrité des radeaux lipidiques. Une diminution de l'expression de l'EGFR généralement surexprimé dans le cancer et favorisant la prolifération cellulaire a aussi été observée au niveau des radeaux, ce qui suggère que les voies de signalisation dépendantes des radeaux lipidiques sont également perturbées suite à la désorganisation de ces microdomaines.

En conséquence, la réduction de la lipogenèse et de la synthèse du cholestérol ainsi que la désorganisation des microdomaines membranaires plasmiques ont généré une réduction de la croissance et de la migration des cellules cancéreuses du sein.

Globalement, ces résultats ont permis de confirmer les hypothèses de notre étude et suggèrent un rôle thérapeutique potentiel du cholest-4-èn-3-one dans le cancer du sein. De plus, ils indiquent que le cholest-4-èn-3-one est un métabolite original qui agit comme un agoniste de LXR sans provoquer d'effets indésirables (lipogenèse accrue).

Conclusion générale et perspectives

Afin de valoriser la biodiversité et la chimiodiversité marine du Liban, *Laurencia papillosa*, une macroalgue rouge répandue sur la côte rocheuse libanaise, a été sélectionnée pour le présent travail. Le travail de recherche a porté sur trois axes majeurs. Premièrement, nous nous sommes intéressés à la recherche de composés cytotoxiques sur une lignée cellulaire du cancer du sein grâce au fractionnement bioguidé de l'extrait de cette macroalgue et à la compréhension de leur mécanisme d'action. En parallèle et pour la première fois, une étude sur les lipides de *L. papillosa* de la côte libanaise a été réalisée pour élargir nos connaissances sur leur composition. Nous avons également étudié l'effet du cholest-4-èn-3-one, un stéroïde trouvé dans une fraction bioactive de *L. papillosa*, sur le métabolisme des lipides dans deux lignées de cancer du sein et son impact sur la croissance cellulaire.

Les macroalgues marines se sont révélées être une source prometteuse de nouveaux composés bioactifs structurellement divers ayant une application potentielle dans le traitement du cancer. C'est dans ce contexte que le premier objectif du travail de recherche était d'identifier des composés cytotoxiques de *L. papillosa* et de comprendre leur mécanisme d'action. Deux lots d'algues collectés sur le même site et au même mois mais à un an d'intervalle, ont été examinés. L'extrait de CH₂Cl₂/MeOH (50 :50) de *L. papillosa* s'est révélé cytotoxique sur les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et a fait l'objet d'un travail de fractionnement bioguidé.

Dans un premier temps, un fractionnement bioguidé d'une petite quantité d'extrait d'un premier lot d'algues a été entrepris et a retenu une fraction acétonique comme étant la plus prometteuse. Cette dernière présentait une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses et une expression réduite du marqueur anti-apoptotique Bcl-2 et du marqueur des radeaux lipidiques flotilline-2. Par la suite, une analyse déréplicative par spectrométrie de masse à haute résolution de cette fraction bioactive a permis d'identifier le cholest-4-èn-3-one, qui a fait l'objet de tests biologiques ultérieurs sur deux lignées de cellules cancéreuses du sein.

Dans un second temps, l'extrait d'un nouveau lot d'algues a fait l'objet d'un travail de fractionnement bioguidé à grande échelle. Quatre fractions d'intérêt ont été sélectionnées pour cette partie. Plusieurs étapes de fractionnements successifs de ces fractions ont été effectuées à l'aide de différentes méthodes chromatographiques mais n'ont toutefois pas conduit à l'isolement de composés cytotoxiques purs, car la quantité était insuffisante pour poursuivre la purification.

Les résultats préliminaires obtenus sont encourageants. En vue de compléter ce travail, il serait pertinent de poursuivre les étapes de purification bioguidée afin d'isoler et d'identifier les composés purs responsables de l'activité cytotoxique sur MCF-7 et de définir leur mécanisme d'action. En outre, il

convient de noter qu'à l'issue de la première étape du fractionnement bioguidé à grande échelle, nous avons obtenu un grand nombre de fractions, ce qui a rendu l'étude biologique assez lourde et, surtout, cette première étape n'a pas permis d'obtenir des fractions pour lesquelles l'activité biologique était spécifiquement concentrée. Au cours du sous-fractionnement, nous avons ensuite été rapidement confrontés à un problème de quantités de nos sous-fractions, limitant les purifications et les caractérisations ultérieures. Devant cela, un nouveau fractionnement bioguidé de l'extrait brut pourrait être envisagé. De plus, face aux limites rencontrées par le fractionnement bioguidé, il pourrait également être intéressant d'approfondir l'identification par déréglication des composés actifs au sein de nos fractions. Une approche métabolomique associant des techniques séparatives (CLHP) et d'identification structurale (SM, RMN) sera nécessaire. Il conviendra également de s'appuyer sur une base de données exhaustive des molécules d'algues et d'utiliser des outils d'analyse statistique adaptés. En outre, il a été démontré que la combinaison de la métabolomique et des essais biologiques permet de prédire efficacement les composés d'intérêt biologiquement actifs au cours de la première étape du fractionnement afin de détecter et d'identifier rapidement les composés bioactifs (Yuliana *et al.* 2011 ; Tawfike *et al.* 2018).

L'objectif de la deuxième partie de cette thèse était d'étudier la composition lipidique de *Laurencia papillosa*, aucune étude de ce type n'ayant encore été menée sur cette espèce de la côte libanaise. Dans l'ensemble, nos résultats semblaient conformes aux recherches antérieures. Il a été constaté que *L. papillosa* collectée de la côte libanaise avait une faible teneur en lipides totaux de 0,74% de la matière sèche et que la classe de lipides principale était les glycolipides (47,6%), suivis des lipides neutres (31,42%) et des phospholipides (20,98%). Parmi les trois classes de lipides, la fraction des glycolipides avait la meilleure activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses du sein MCF-7. En terme de composition en acides gras, il a été constaté que les AGS constituaient la principale classe d'acides gras, l'acide palmitique étant le plus abondant, suivi de la classe des AGPI en C20, principalement l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque. L'acide oléique était le plus prédominant parmi les AGMI. En outre, neuf stérols ont été identifiés et le cholestérol s'est révélé le plus dominant.

La composition en lipides des macroalgues marines est généralement influencée par le site et la période de récolte, ce qui peut s'expliquer par la variation de facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, la salinité et les nutriments (Wielgosz-Collin, Kendel, and Couzinet-Mossion 2016). Par conséquent, l'étude de l'effet des facteurs environnementaux sur la teneur en lipides et sur la composition en acides gras et en stérols chez *L. papillosa* semble intéressante à mener.

La fraction de glycolipides ayant une activité cytotoxique importante, il peut être intéressant de la purifier pour identifier le composé responsable de cette activité. Selon la littérature, plusieurs glycolipides isolés de macroalgues marines ont montré des activités cytotoxiques sur les cellules cancéreuses, y compris l'hexadecyl-1-O- α -L-arabinopyranoside isolé de *Laurencia majuscula* sur les cellules du cancer du côlon et du foie (Du *et al.* 2010) et les nigricanosides A et B isolés de *Avrainvillea nigricans* (algue verte) sur les cellules cancéreuses du sein et du côlon (Williams *et al.* 2007). En outre, il sera intéressant de voir si les glycolipides actifs décrits dans la littérature sont présents dans notre fraction de glycolipides. Dans ce cas, nous pouvons analyser la fraction de glycolipides par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution, et nous verrons par la suite si l'activité est liée à un ion m/z correspondant à la formule moléculaire des glycolipides bioactifs décrits dans la littérature.

Comme mentionné ci-dessus, le cholest-4- β -3-one a été trouvé dans une fraction bioactive issue d'un fractionnement bioguidé à petite échelle de *L. papillosa*. Ce composé a été évalué *in vitro* sur deux lignées cellulaires de cancer du sein, MCF-7 et MDA-MB-231. L'altération de la lipogenèse et de la biosynthèse du cholestérol a été rapportée dans de nombreux types de cancers. Il a été trouvé ici que le cholest-4- β -3-one réduit l'expression des enzymes impliquées dans la lipogenèse (ACC1, FASN et SCD1) et la biosynthèse du cholestérol (HMGCR). L'altération du métabolisme des lipides conduit généralement à des taux élevés de cholestérol dans les cellules cancéreuses. Dans la présente étude, le cholest-4- β -3-one a augmenté l'expression des transporteurs ABCG1 et ABCA1, stimulant ainsi l'efflux de cholestérol cellulaire. L'agoniste inverse de LXR, SR9238, est connu pour inhiber l'activation de LXR, nous avons donc examiné dans les cellules cancéreuses du sein l'effet du cholest-4- β -3-one co-incubé avec du SR9238 sur l'expression de ABCG1 et ABCA1. Nos données ont montré que l'augmentation de l'expression des transporteurs ABC induite par le cholest-4- β -3-one dépendait de l'activation de LXR. De plus, nous avons montré que l'expression de LXR et de ses gènes cibles impliqués dans l'efflux de cholestérol ABCA1, ABCG1 et APOE augmente dans les macrophages dérivés de THP-1 traités avec du cholest-4- β -3-one, ce qui confirme les résultats obtenus sur l'expression de transporteurs ABC dans les cellules cancéreuses du sein et montre que le cholest-4- β -3-one peut agir en tant qu'activateur de LXR. Par conséquent, l'altération de la teneur en cholestérol intracellulaire a désorganisé les radeaux lipidiques, comme le montre la réduction de l'expression de la flotilline-2, marqueur des radeaux, entraînant ainsi une dérégulation des voies de signalisation observée par une diminution de l'expression de l'EGFR contrôlant généralement la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces effets peut *in fine*

expliquer la diminution de croissance et de migration observée dans les lignées cellulaires du cancer du sein étudiées. De plus, nous avons constaté que le cholest-4-èn-3-one exerce une activité agoniste de LXR sans augmenter la lipogenèse. Cet effet est particulièrement prometteur car la particularité de la majorité des agonistes de LXR active la lipogenèse, qui à ce jour a limité leur développement dans les essais cliniques. Par conséquent, le cholest-4-èn-3-one semble être un bon candidat pour le traitement du cancer du sein. Ces résultats permettent d'envisager plusieurs perspectives de recherche.

Un test d'activité transcriptionnelle avec un plasmide rapporteur de la luciférase peut être envisagé pour confirmer l'effet agoniste de LXR du cholest-4-èn-3-one (Li *et al.* 2014).

De plus, un knockdown de LXR médié par siRNA peut être réalisé pour confirmer davantage si l'augmentation de l'expression de ABCG1 et ABCA1 par le cholest-4-èn-3-one dans les cellules de cancer du sein était dépendante de LXR (Li *et al.* 2014).

Dans la modulation de la lipogenèse, il serait intéressant d'étudier l'accumulation de lipides dans les cellules cancéreuses du sein après un traitement au cholest-4-èn-3-one en utilisant Oil Red O (Li *et al.* 2014).

Par la suite, pour l'étude de l'efflux, il sera judicieux de procéder à un marquage spécifique du cholestérol membranaire et intracellulaire en utilisant des analogues de cholestérol radioactifs tels que le ³H-cholestérol ou fluorescents tels que le 22-NBD-cholestérol (El Roz *et al.* 2012 ; Li *et al.* 2014).

Comme mentionné ci-dessus, les radeaux lipidiques coordonnent diverses voies de signalisation dont l'activation anormale peut causer le cancer, ce qui en fait une cible potentielle dans le traitement du cancer. Il serait donc judicieux d'étudier l'effet du cholest-4-èn-3-one sur les voies de signalisation compartimentées dans les radeaux lipidiques, telles que les voies PI3K/AKT et MAPK impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire (Reis-Sobreiro *et al.* 2013).

En outre, il est connu que le cholest-4-èn-3-one est un métabolite du microbiote intestinal (Chen *et al.* 2017). Des études nutritionnelles *in vivo* peuvent être envisagées pour augmenter la production du cholest-4-èn-3-one par le microbiote intestinal.

Enfin, il serait pertinent de confirmer l'effet anticancéreux du cholest-4-èn-3-one *in vivo* chez des souris nudes portant des xénogreffes de cellules cancéreuses du sein humain traitées au cholest-4-èn-3-one (Pommier *et al.* 2010).

Ce travail de thèse est le fruit d'une collaboration entre deux laboratoires français et libanais. Il repose sur la recherche par biosuivi et la valorisation d'une ressource macroalgale de la côte libanaise. Il comprend plusieurs étapes depuis la récolte, le séchage, l'extraction, le fractionnement bioguidé, les

analyses déréplicatives et l'évaluation pharmacologique d'un composé identifié dans une fraction. Il a permis de mettre en évidence les limites de l'utilisation du fractionnement bioguidé et de montrer l'intérêt de la mise en œuvre de la déréplication. De plus, ce travail de thèse a permis pour la première fois d'analyser les lipides de *Laurencia papillosa* de la côte libanaise et d'identifier le cholest-4-èn-3-one dans l'une des fractions. Ce métabolite a montré un effet anticancéreux prometteur dans nos modèles de cancer du sein en diminuant la lipogenèse tumorale et en exerçant une action agoniste de LXR.

Références bibliographiques

- Abd El Baky, H., El Baz, F. K., El baroty, G., Asker, M., & Ibrahim, E. A. (2014). Phospholipids of some marine macroalgae: Identification, antiviral, anticancer and antimicrobial bioactivities. *Der Pharma Chemica*, *6*, 370–382.
- Abdel-Mageed, W. M., Ebel, R., Valeriote, F. A., & Jaspars, M. (2010). Laurefurenynes A–F, new Cyclic Ether Acetogenins from a Marine Red Alga, *Laurencia* sp. *Tetrahedron*, *66*(15), 2855–2862. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.02.041>
- Abdullah, H., & Abdullah, N. S. (2013). Fatty acids profiles of red seaweed, *Gracilaria manilaensis*, *11*(5), 726–732.
- Abou-Elnaga, Z. S., Alarif, W. M., & Al-lihaibi, S. (2011). New Larvicidal Acetogenin from the Red Alga *Laurencia papillosa*. *CLEAN – Soil, Air, Water*, *39*(8), 787–794. <https://doi.org/10.1002/clen.201000597>
- Abramson, H. N. (2011). The Lipogenesis Pathway as a Cancer Target. *Journal of Medicinal Chemistry*, *54*(16), 5615–5638. <https://doi.org/10.1021/jm2005805>
- Aknin, M., Miralles, J., & Kornprobst, J.-M. (1990). Sterol and fatty acid distribution in red algae from the senegalese coast. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *96*(3), 559–563. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90056-Y](https://doi.org/10.1016/0305-0491(90)90056-Y)
- Al Easa, H. S., Kornprobst, J.-M., & Rizk, A. M. (1995). Major sterol composition of some algae from Qatar. *Phytochemistry*, *39*(2), 373–374. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00968-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00968-Y)
- Alarif, W. M., Al-Lihaibi, S. S., Ayyad, S. E., Abdel-Rhman, M. H., & Badria, F. A. (2012). Laurene-type sesquiterpenes from the Red Sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumor-antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *55*, 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.060>
- Alarif, W. M., Al-Footy, K. O., Zubair, M. S., Halid Ph, M., Ghandourah, M. A., Basaif, S. A., Al-Lihaibi, S. S., Ayyad, S-E. N., & Badria, F. A. (2016). The role of new eudesmane-type sesquiterpenoid and known eudesmane derivatives from the red alga *Laurencia obtusa* as potential antifungal-antitumour agents. *Natural Product Research*, *30*(10), 1150–1155. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1046378>
- Alarif, W. M., Al-Lihaibi, S. S., Abdel-Lateff, A., & Ayyad, S.-E. N. (2011). New antifungal cholestane and aldehyde derivatives from the red alga *Laurencia papillosa*. *Natural Product Communications*, *6*(12), 1821–1824.
- Al-Fadhli, A., Wahidulla, S., & D'Souza, L. (2006). Glycolipids from the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura. *Glycobiology*, *16*(10), 902–915. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl018>

- Al-lihaibi, S. S., Ayyad, S.-E. N., Al-wessaby, E., & Alarif, W. M. (2010). 3b, 7b-Dihydroxy-5a-cholestan-11-one: A new oxidation pattern of cholestane skeleton from *Laurencia papillosa*, *38*(4), 861–863. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.08.009>
- Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., Alpoim, M. C., Botana, L. M., & Pedrosa, R. (2018). From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00777>
- Ambrozova, J. V., Misurcova, L., Vicha, R., Machu, L., Samek, D., Baron, M., & Jurikova, T. (2014). Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green Microalga *Chlorella kessleri* and the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Molecules*, *19*(2), 2344–2360. <https://doi.org/10.3390/molecules19022344>
- Angawi, R. F., Alarif, W. M., Hamza, R. I., Badria, F. A., & Ayyad, S.-E. N. (2014). New Cytotoxic Laurene-, Cuparene-, and Laurokamurene-Type Sesquiterpenes from the Red Alga *Laurencia obtusa*. *Helvetica Chimica Acta*, *97*(10), 1388–1395. <https://doi.org/10.1002/hlca.201300464>
- Angelucci, C., D'Alessio, A., Iacopino, F., Proietti, G., Di Leone, A., Masetti, R., & Sica, G. (2018). Pivotal role of human stearoyl-CoA desaturases (SCD1 and 5) in breast cancer progression: oleic acid-based effect of SCD1 on cell migration and a novel pro-cell survival role for SCD5. *Oncotarget*, *9*(36), 24364–24380. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25273>
- Argmann, C. A., Edwards, J. Y., Sawyez, C. G., O'Neil, C. H., Hegele, R. A., Pickering, J. G., & Huff, M. W. (2005). Regulation of Macrophage Cholesterol Efflux through Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibition a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(23), 22212–22221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502761200>
- Atta-ur-Rahman, Choudhary, M. I., & Thomsen, W. J. (2001). *Bioassay Techniques for Drug Development*. Taylor & Francis.
- Awad, N. E. (2004). Bioactive brominated diterpenes from the marine red alga *Jania rubens* (L.) Lamx. *Phytotherapy Research: PTR*, *18*(4), 275–279. <https://doi.org/10.1002/ptr.1273>
- Baenke, F., Peck, B., Miess, H., & Schulze, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms*, *6*(6), 1353–1363. <https://doi.org/10.1242/dmm.011338>
- Bang, B., Gniadecki, R., & Gajkowska, B. (2005). Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Experimental Dermatology*, *14*(4), 266–272. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2005.00283.x>

- Banning, A., Kurrle, N., Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Cancer. *Cells*, 3(1), 129–149. <https://doi.org/10.3390/cells3010129>
- Bao, J., Zhu, L., Zhu, Q., Su, J., Liu, M., & Huang, W. (2016). SREBP-1 is an independent prognostic marker and promotes invasion and migration in breast cancer. *Oncology Letters*, 12(4), 2409–2416. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4988>
- Barcellos Marini, M., Rodrigues de Freitas, W., Lacerda da Silva Machado, F., Correa Ramos Leal, I., Ribeiro Soares, A., Masahiko Kanashiro, M., & Frazão Muzitano, M. (2018). Cytotoxic activity of halogenated sesquiterpenes from *Laurencia dendroidea*. *Phytotherapy Research: PTR*, 32(6), 1119–1125. <https://doi.org/10.1002/ptr.6052>
- Barnathan, G. (1993). *Acides gras et stérols d'éponges marines du Sénégal et de Nouvelle-Calédonie* (Thèse de doctorat). Université de Nantes. <http://www.theses.fr/1993NANT01VS>
- Baumann, J., Sevinsky, C., & Conklin, D. S. (2013). Lipid biology of breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(10), 1509–1517. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.03.011>
- Bawakid, N. O., Alarif, W. M., Alburae, N. A., Alorfi, H. S., Al-Footy, K. O., Al-Lihaibi, S. S., & Ghandourah, M. A. (2017). Isolaurenidificin and Bromlaurenidificin, Two New C15-Acetogenins from the Red Alga *Laurencia obtusa*. *Molecules*, 22(5), 807-814. <https://doi.org/10.3390/molecules22050807>
- Belkaid, A., Duguay, S. R., Ouellette, R. J., & Surette, M. E. (2015). 17 β -estradiol induces stearyl-CoA desaturase-1 expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *BMC Cancer*, 15, 440-453. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1452-1>
- Beloribi-Djefafli, S., Vasseur, S., & Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, 5(1), e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>
- Bengoechea-Alonso, M. T., & Ericsson, J. (2009). A Phosphorylation Cascade Controls the Degradation of Active SREBP1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9), 5885–5895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807906200>
- Berger, T., Ueda, T., Arpaia, E., Chio, I. I. C., Shirdel, E. A., Jurisica, I., & Mak, T. W. (2013). Flotillin-2 deficiency leads to reduced lung metastases in a mouse breast cancer model. *Oncogene*, 32(41), 4989–4994. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.499>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>

- Blücher, C., & Stadler, S. C. (2017). Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression. *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00293>
- Bodin, S., Planchon, D., Morris, E. R., Comunale, F., & Gauthier-Rouvière, C. (2014). Flotillins in intercellular adhesion – from cellular physiology to human diseases. *Journal of Cell Science*, 127(24), 5139–5147. <https://doi.org/10.1242/jcs.159764>
- Bou Khalil, M., Hou, W., Zhou, H., Elisma, F., Swayne, L. A., Blanchard, A. P., Yao, Z., Bennett, S. A. L., & Figeys, D. (2010). Lipidomics era: accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Reviews*, 29(6), 877–929. <https://doi.org/10.1002/mas.20294>
- Bouga, M., & Combet, E. (2015). Emergence of Seaweed and Seaweed-Containing Foods in the UK: Focus on Labeling, Iodine Content, Toxicity and Nutrition. *Foods*, 4(2), 240–253. <https://doi.org/10.3390/foods4020240>
- Calder, P. C., & Burdge, G. C. (2012). Chapter 1 - Fatty acids. In A. Nicolaou & G. Kokotos (Eds.), *Bioactive Lipids* (pp. 1–36). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857097934.1>
- Campos, A., Souza, C. B., Lhullier, C., Falkenberg, M., Schenkel, E. P., Ribeiro-do-Valle, R. M., & Siqueira, J. M. (2012). Anti-tumour effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae *Laurencia microcladia*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(8), 1146–1154. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01493>.
- Candelaria, N. R., Addanki, S., Zheng, J., Nguyen-Vu, T., Karaboga, H., Dey, P., & Lin, C.-Y. (2014). Antiproliferative Effects and Mechanisms of Liver X Receptor Ligands in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *PLOS ONE*, 9(9), e106289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106289>
- Cao, K., Xie, D., Cao, P., Zou, Q., Lu, C., Xiao, S., Zhou, J., Peng, X. (2014). SiRNA-mediated flotillin-2 (Flot2) downregulation inhibits cell proliferation, migration, and invasion in gastric carcinoma cells. *Oncology Research*, 21(5), 271–279. <https://doi.org/10.3727/096504014X13946737557031>
- Carter, G. T., Rinehart, K. L., Li, L. H., Kuentzel, S. L., & Connor, J. L. (1978). Brominated indoles from *Laurencia brongniartii*. *Tetrahedron Letters*, 19(46), 4479–4482. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95257-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95257-8)
- Cen-Pacheco, F., Villa-Pulgarin, J. A., Mollinedo, F., Martín, M. N., Fernández, J. J., & Daranas, A. H. (2011a). New Polyether Triterpenoids from *Laurencia viridis* and Their Biological Evaluation. *Marine Drugs*, 9(11), 2220–2235. <https://doi.org/10.3390/md9112220>

- Cen-Pacheco, F., Villa-Pulgarin, J. A., Mollinedo, F., Norte, M., Daranas, A. H., & Fernández, J. J. (2011b). Cytotoxic oxasqualenoids from the red alga *Laurencia viridis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(8), 3302–3308. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.051>
- Cen-Pacheco, F., Mollinedo, F., Villa-Pulgarín, J. A., Norte, M., Fernández, J. J., & Hernández Daranas, A. (2012). Saiyacenols A and B: the key to solve the controversy about the configuration of aplysiols. *Tetrahedron*, *68*(36), 7275–7279. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.07.005>
- Chajès, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G. M., & Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Research*, *66*(10), 5287–5294. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1489>
- Chen, C.-L., Wu, D.-C., Liu, M.-Y., Lin, M.-W., Huang, H.-T., Huang, Y.-B., Chen, L.-C., & Chen, P.-Y. (2017). Cholest-4-en-3-one attenuates TGF- β responsiveness by inducing TGF- β receptors degradation in Mv1Lu cells and colorectal adenocarcinoma cells. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, *37*(2), 189–199. <https://doi.org/10.1080/10799893.2016.1203944>
- Chen, M., Yang, F., Kang, J., Gan, H., Yang, X., Lai, X., & Gao, Y. (2018). Identification of Potent LXR β -Selective Agonists without LXR α Activation by In Silico Approaches. *Molecules*, *23*(6), 1349–1362. <https://doi.org/10.3390/molecules23061349>
- Cheng, C., Wang, Z., & Chen, J. (2014). Targeting FASN in Breast Cancer and the Discovery of Promising Inhibitors from Natural Products Derived from Traditional Chinese Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2014/232946>
- Choi, Y. K., Kim, J., Lee, K. M., Choi, Y.-J., Ye, B.-R., Kim, M.-S., Ko, S.-G., Lee, S.-H., Kang, D.-H., & Heo, S.-J. (2017). Tuberatolide B Suppresses Cancer Progression by Promoting ROS-Mediated Inhibition of STAT3 Signaling. *Marine Drugs*, *15*(3), 55–67. <https://doi.org/10.3390/md15030055>
- Chuu, C.-P., & Lin, H.-P. (2010). Antiproliferative Effect of LXR Agonists T0901317 and 22(R)-Hydroxycholesterol on Multiple Human Cancer Cell Lines. *Anticancer Research*, *30*(9), 3643–3648.
- Clendening, J. W., Pandyra, A., Boutros, P. C., El Ghamrasni, S., Khosravi, F., Trentin, G. A., Martirosyan, A., & Penn, L. Z. (2010). Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(34), 15051–15056. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910258107>
- Collins, J. L., Fivush, A. M., Watson, M. A., Galardi, C. M., Lewis, M. C., Moore, L. B., Parks, D. J., & Willson, T. M. (2002). Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(10), 1963–1966.

- Cortes, V. A., Busso, D., Maiz, A., Arteaga, A., Nervi, F., & Rigotti, A. (2014). Physiological and pathological implications of cholesterol. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *19*, 416–428.
- Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Marine Drugs*, *13*(4), 1925–1965. <https://doi.org/10.3390/md13041925>
- Darimont, C., Avanti, O., Zbinden, I., Leone-Vautravers, P., Mansourian, R., Giusti, V., & Macé, K. (2006). Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes. *Biochimie*, *88*(3), 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.08.010>
- Dawczynski, C., Schubert, R., & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, *103*(3), 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.041>
- De Vos, R. C. H., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J. B., Bino, R. J., & Hall, R. D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, *2*(4), 778–791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.95>
- Déléris, P., Nazih, H., & Bard, J.-M. (2016). Chapter 10 - Seaweeds in Human Health. In J. Fleurence & I. Levine (Eds.), *Seaweed in Health and Disease Prevention* (pp. 319–367). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00010-5>
- Dembitsky, V. M., & Rozentsvet, O. A. (1990). Phospholipid composition of some marine red algae. *Phytochemistry*, *29*(10), 3149–3152. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80175-G](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80175-G)
- Du, B., Zhong, X., Liao, X., Xu, W., Zhou, X., & Xu, S. (2010). A new antitumor arabinopyranoside from *Laurencia majuscula* induces G2/M cell cycle arrest. *Phytotherapy Research*, *24*(10), 1447–1450. <https://doi.org/10.1002/ptr.3153>
- Dubois, L., Ronquist, K. (K) G., Ek, B., Ronquist, G., & Larsson, A. (2015). Proteomic Profiling of Detergent Resistant Membranes (Lipid Rafts) of Prostatomes. *Molecular & Cellular Proteomics*, *14*(11), 3015–3022. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.047530>
- Duffy, D., & Rader, D. J. (2009). Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nature Reviews. Cardiology*, *6*(7), 455–463. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.94>
- Dziwornu, G. A., Caira, M. R., Mare, J.-A. de la, Edkins, A. L., Bolton, J. J., Beukes, D. R., & Sunassee, S. N. (2017). Isolation, Characterization and Antiproliferative Activity of New Metabolites from the South African Endemic Red Algal Species *Laurencia alfredensis*. *Molecules*, *22*(4), 513–529. <https://doi.org/10.3390/molecules22040513>

- Eitsuka, T., Nakagawa, K., Igarashi, M., & Miyazawa, T. (2004). Telomerase inhibition by sulfoquinovosyldiacylglycerol from edible purple laver (*Porphyra yezoensis*). *Cancer Letters*, 212(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.03.019>
- El Baroty, G. S., El Baz, F.K, Abd-Elmoein, I., Abd El Baky, H. H., Ali Mohamed, M., & Ibrahim Eman, A. (2011). Evaluation of glycolipids of some Egyptian marine algae as a source of bioactive substances, *International Research Journal of Pharmacy*, 2(3), 165–174.
- El Baroty, G. S., El Baz, F.K, Ibrahim Eman, A., & Abd El Baky, H. H. (2014). Cytotoxicity, Antioxidants and Antimicrobial Activities of Lipids Extracted from Some Marine Algae. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 05(07), 284–289. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000284>
- El Baz, F. K., El Baroty, G. S., Abd El Baky, H. H., Abd El-Salam, O. I., & Ibrahim, E. A. (2013). Structural characterization and Biological Activity of Sulfolipids from selected Marine Algae. *Grasas y Aceites*, 64(5), 561–571. <https://doi.org/10.3989/gya.050213>
- El Gamal, A. A., Wang, W.-L., & Duh, C.-Y. (2005). Sulfur-containing polybromoindoles from the Formosan red alga *Laurencia brongniartii*. *Journal of Natural Products*, 68(5), 815–817. <https://doi.org/10.1021/np058001y>
- El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>
- El Roz, A., Bard, J.-M., Huvelin, J.-M., & Nazih, H. (2012). LXR Agonists and ABCG1-dependent Cholesterol Efflux in MCF-7 Breast Cancer Cells: Relation to Proliferation and Apoptosis. *Anticancer Research*, 32(7), 3007–3013.
- El Roz, A., Bard, J.-M., Valin, S., Huvelin, J.-M., & Nazih, H. (2013). Macrophage apolipoprotein E and proliferation of MCF-7 breast cancer cells: role of LXR. *Anticancer Research*, 33(9), 3783–3789.
- Erickson, K. L., Beutler, J. A., Gray, G. N., Cardellina, J. H., & Boyd, M. R. (1995). Majapolene A, a cytotoxic peroxide, and related sesquiterpenes from the red alga *Laurencia majuscula*. *Journal of Natural Products*, 58(12), 1848–1860.
- Esselin, H., Tomi, F., Bighelli, A., Sutour, S., Esselin, H., Tomi, F., Bighelli, A., & Sutour, S. (2018). New Metabolites Isolated from a *Laurencia obtusa* Population Collected in Corsica. *Molecules*, 23(4), 720–730. <https://doi.org/10.3390/molecules23040720>
- Fernández, J., Souto, M. L., & Norte, M. (1998). Evaluation of the cytotoxic activity of polyethers isolated from *Laurencia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6(12), 2237–2243. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(98\)80004-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(98)80004-7)

- Flaveny, C. A., Griffett, K., El-Gendy, B. E.-D. M., Kazantzis, M., Sengupta, M., Amelio, A. L., Chatterjee, A., & Burris, T. P. (2015). Broad Anti-tumor Activity of a Small Molecule that Selectively Targets the Warburg Effect and Lipogenesis. *Cancer Cell*, 28(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.007>
- Fleurence, J., & Levine, I. (2016). *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Academic Press.
- Francisco, M. E., & Erickson, K. L. (2001). Ma'iliohydrin, a cytotoxic chamigrene dibromohydrin from a Philippine *Laurencia* species. *Journal of Natural Products*, 64(6), 790–791.
- Furuno, A., Watari, K., Nakamura, M., Fukunaga, Y., Jung, J. H., & Ono, M. (2011). A natural anti-inflammatory enone fatty acid inhibits angiogenesis by attenuating nuclear factor- κ B signaling in vascular endothelial cells. *International Journal of Oncology*, 38(2), 493–501. <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.856>
- Gajate, C., Gonzalez-Camacho, F., & Mollinedo, F. (2009). Involvement of Raft Aggregates Enriched in Fas/CD95 Death-Inducing Signaling Complex in the Antileukemic Action of Edelfosine in Jurkat Cells. *PLoS ONE*, 4(4), e5044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005044>
- Gelissen, I. C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A. J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., & Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(3), 534–540. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000200082.58536.e1>
- Ghannam, A., Murad, H., Jazzara, M., Odeh, A., & Allaf, A. W. (2018). Isolation, Structural characterization, and antiproliferative activity of phycocolloids from the red seaweed *Laurencia papillosa* on MCF-7 human breast cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 916–926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.001>
- González, A. G., Darias, V., & Estévez, E. (1982). Chemotherapeutic activity of polyhalogenated terpenes from Spanish algae. *Planta Medica*, 44(1), 44–46.
- Grefhorst, A., Elzinga, B. M., Voshol, P. J., Plösch, T., Kok, T., Bloks, V. W., & Kuipers, F. (2002). Stimulation of Lipogenesis by Pharmacological Activation of the Liver X Receptor Leads to Production of Large, Triglyceride-rich Very Low Density Lipoprotein Particles. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34182–34190. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204887200>
- Gressler, V., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Colepicolo, P., Filho, J. M., Torres, R. P., & Pinto, E. (2010). Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry*, 120(2), 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.028>

- Griffett, K., & Burris, T. P. (2016). Promiscuous activity of the LXR antagonist GSK2033 in a mouse model of fatty liver disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(3), 424–428. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.036>
- Gross, H., Goeger, D. E., Hills, P., Mooberry, S. L., Ballantine, D. L., Murray, T. F., Valeriote, F. A., & Gerwick, W. H. (2006). Lophocladines, bioactive alkaloids from the red alga *Lophocladia* sp. *Journal of Natural Products*, 69(4), 640–644. <https://doi.org/10.1021/np050519e>
- Guéguinou, M., Gambade, A., Félix, R., Chantôme, A., Fourbon, Y., Bougnoux, P., Weber, G., Potier-Cartereau, M., & Vandier, C. (2015). Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca²⁺ channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848 (10, Part B), 2603–2620. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.036>
- Guihéneuf, F., Schmid, M., & Stengel, D. B. (2015). Lipids and Fatty Acids in Algae: Extraction, Fractionation into Lipid Classes, and Analysis by Gas Chromatography Coupled with Flame Ionization Detector (GC-FID). *Methods in Molecular Biology*, 1308, 173–190. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8_11
- Gunstone, F. D. (1996). Lipids — Nomenclature, structure, biosynthesis, and chemical synthesis. In *Fatty Acid and Lipid Chemistry* (pp. 35–60). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4131-8_2
- Hager, M. H., Solomon, K. R., & Freeman, M. R. (2006). The role of cholesterol in prostate cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9(4), 379–385. <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000232896.66791.62>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harizani, M., Ioannou, E., & Roussis, V. (2016). The *Laurencia* Paradox: An Endless Source of Chemodiversity. In A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, & J. Kobayashi (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 102* (pp. 91–252). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33172-0_2
- Harwood, J. L., Gurr, M. I., Frayn, K. N., Murphy, D. J., & Michell, R. H. (2016). *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health*. John Wiley & Sons.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., Hingorani, S. R., Tuveson, D. A., & Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*, 8(4), 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.09.008>

- Hazarika, P., McCarty, M. F., Prieto, V. G., George, S., Babu, D., Koul, D., Bar-Eli, M., & Duvic, M. (2004). Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer Research*, *64*(20), 7361–7369. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0823>
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, *23*(3), 543–597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
- Hong, C., & Tontonoz, P. (2014). Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(6), 433–444. <https://doi.org/10.1038/nrd4280>
- Horton, J. D. (2002). Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochemical Society Transactions*, *30*(Pt 6), 1091–1095. <https://doi.org/10.1042/>
- Hryniewicz-Jankowska, A., Augoff, K., Biernatowska, A., Podkalicka, J., & Sikorski, A. F. (2014). Membrane rafts as a novel target in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1845*(2), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.006>
- Huang, X., Sun, Y.-L., Salim, A. A., Chen, Z.-S., & Capon, R. J. (2013). Parguerenes: Marine red alga bromoditerpenes as inhibitors of P-glycoprotein (ABCB1) in multidrug resistant human cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, *85*(9), 1257–1268. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.005>
- Ichihara, E., Kiura, K., & Tanimoto, M. (2011). Targeting angiogenesis in cancer therapy. *Acta Medica Okayama*, *65*(6), 353–362. <https://doi.org/10.18926/AMO/47260>
- Iliopoulou, D., Mihopoulos, N., Vagias, C., Papazafiri, P., & Roussis, V. (2003). Novel cytotoxic brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *The Journal of Organic Chemistry*, *68*(20), 7667–7674. <https://doi.org/10.1021/jo0342323>
- Irie, T., Suzuki, M., & Masamune, T. (1965). Laurencin, a constituent from *Laurencia* species. *Tetrahedron Letters*, *6*(16), 1091–1099. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)90038-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)90038-8)
- Jaspars, M., Pascale, D. D., Andersen, J. H., Reyes, F., Crawford, A. D., & Ianora, A. (2016). The marine biodiversity pipeline and ocean medicines of tomorrow. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *96*(1), 151–158. <https://doi.org/10.1017/S0025315415002106>
- Jazzara, M., Ghannam, A., Soukkaieh, C., & Murad, H. (2016). Anti-Proliferative Activity of λ -Carrageenan Through the Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, *9*(4), e3836. <https://doi.org/10.17795/ijcp-3836>

- Ji, N.-Y., Li, X.-M., Xie, H., Ding, J., Li, K., Ding, L.-P., & Wang, B.-G. (2008). Highly Oxygenated Triterpenoids from the Marine Red Alga *Laurencia mariannensis* (Rhodomelaceae). *Helvetica Chimica Acta*, *91*(10), 1940–1946. <https://doi.org/10.1002/hlca.200890207>
- Jin, Q., Yuan, L. X., Boulbes, D., Baek, J. M., Wang, Y. N., Gomez-Cabello, D., Hawke, D. H., & Esteva, F. J. (2010). Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Research : BCR*, *12*(6), R96. <https://doi.org/10.1186/bcr2777>
- Jones, S. F., & Infante, J. R. (2015). Molecular Pathways: Fatty Acid Synthase. *Clinical Cancer Research*, *21*(24), 5434–5438. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0126>
- Joseph, S. B., Laffitte, B. A., Patel, P. H., Watson, M. A., Matsukuma, K. E., Walczak, R., Collins, J. L., Osborne, T. F., & Tontonoz, P. (2002). Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11019–11025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111041200>
- Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. A., Collins, A. R., Laffitte, B. A., & Tontonoz, P. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(11), 7604–7609. <https://doi.org/10.1073/pnas.112059299>
- Ju, X., Huang, P., Chen, M., & Wang, Q. (2017). Liver X receptors as potential targets for cancer therapeutics. *Oncology Letters*, *14*(6), 7676–7680. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7259>
- Juagdan, E. G., Kalidindi, R., & Scheuer, P. (1997). Two new chamigranes from an hawaiian red alga, *Laurencia cartilaginea*. *Tetrahedron*, *53*(2), 521–528. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(96\)01002-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(96)01002-2)
- Kamada, T., & Vairappan, C. S. (2013). New bioactive secondary metabolites from Bornean red alga, *Laurencia similis* (Ceramiales). *Natural Product Communications*, *8*(3), 287–288.
- Kamada, T., & Vairappan, C. S. (2017). Non-halogenated new sesquiterpenes from Bornean *Laurencia snackeyi*. *Natural Product Research*, *31*(3), 333–340. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1241996>
- Kamada, T., Phan, C.-S., & Vairappan, C. S. (2017a). Nangallenes A and B, halogenated nonterpenoid C15-acetogenins from the Bornean red alga *Laurencia nangii*. *Journal of Asian Natural Products Research*, *0*(0), 1–7. <https://doi.org/10.1080/10286020.2017.1417265>
- Kamada, T., Phan, C.-S., & Vairappan, C. S. (2017b). New anti-bacterial halogenated tricyclic sesquiterpenes from Bornean *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas. *Natural Product Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1396593>

- Kang, S.-M., Kim, A.-D., Heo, S.-J., Kim, K.-N., Lee, S.-H., Ko, S.-C., & Jeon, Y.-J. (2012). Induction of apoptosis by diphloretohydroxycarmalol isolated from brown alga, *Ishige okamurae*. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.001>
- Karaki, N., Sebaaly, C., Chahine, N., Faour, T., Zinchenko, A., Rachid, S., & Kanaan, H. (2013). The antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the brown algae *Dictyopteris polypodioides* growing on the Lebanese coast. <http://search.proquest.com/openview/b1504a1b15863f49aae9ae957d0c85db/1?pq-origsite=gscholar>
- Kates, M. (1990). *Glycolipids, Phosphoglycolipids, and Sulfoglycolipids*. Springer Science & Business Media.
- Kavita, K., Singh, V. K., & Jha, B. (2014). carter. *Microbiological Research*, 169(4), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.002>
- Kendel, M., Couzinet-Mossion, A., Viau, M., Fleurence, J., Barnathan, G., & Wielgosz-Collin, G. (2013). Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9876-3>
- Kendel, M., Wielgosz-Collin, G., Bertrand, S., Roussakis, C., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2015). Lipid Composition, Fatty Acids and Sterols in the Seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): An Analysis from Nutritional, Chemotaxonomic, and Antiproliferative Activity Perspectives. *Marine Drugs*, 13(9), 5606–5628. <https://doi.org/10.3390/md13095606>
- Khotimchenko, S. V., & Kulikova, I. V. (1999). Lipids of two species of brown algae of the genus *Laminaria*. *Chemistry of Natural Compounds*, 35(1), 17–20. <https://doi.org/10.1007/BF02238203>
- Khotimchenko, S. V. (2002). Distribution of Glyceroglycolipids in Marine Algae and Grasses. *Chemistry of Natural Compounds*, 38(3), 223–229. <https://doi.org/10.1023/A:1020471709232>
- Khotimchenko, S. V. (2003). The Fatty Acid Composition of Glycolipids of Marine Macrophytes. *Russian Journal of Marine Biology*, 29(2), 126–128. <https://doi.org/10.1023/A:1023960825983>
- Khotimchenko, S. V. (2005). Lipids from the Marine Alga *Gracilaria verrucosa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(3), 285–288. <https://doi.org/10.1007/s10600-005-0130-y>
- Khotimchenko, S. V., Vaskovsky, V. E., & Titlyanova, T. V. (2005). Fatty Acids of Marine Algae from the Pacific Coast of North California. *Botanica Marina*, 45(1), 17–22. <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.003>

- Khotimchenko, S. V. (2006). Variations in lipid composition among different developmental stages of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *Botanica Marina*, 49(1), 34–38. <https://doi.org/10.1515/BOT.2006.004>
- Kick, E. K., Busch, B. B., Martin, R., Stevens, W. C., Bollu, V., Xie, Y., & Mohan, R. (2016). Discovery of Highly Potent Liver X Receptor β Agonists. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7(12), 1207–1212. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.6b00234>
- Kim, A. D., Lee, Y., Kang, S.-H., Kim, G. Y., Kim, H. S., & Hyun, J. W. (2013). Cytotoxic effect of clerosterol isolated from *Codium fragile* on A2058 human melanoma cells. *Marine Drugs*, 11(2), 418–430. <https://doi.org/10.3390/md11020418>
- Kim, K. H., Lee, G. Y., Kim, J. I., Ham, M., Won Lee, J., & Kim, J. B. (2010). Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *Journal of Lipid Research*, 51(12), 3425–3433. <https://doi.org/10.1194/jlr.M007989>
- Kim, M.-M., Mendis, E., & Kim, S.-K. (2008). *Laurencia okamurai* Extract Containing Laurinterol Induces Apoptosis in Melanoma Cells. *Journal of Medicinal Food*, 11(2), 260–266. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.575>
- Kim, S.-K., & Lee, C.-G. (2015). *Marine Bioenergy: Trends and Developments*. CRC Press.
- Kladi, M., Vagias, C., Furnari, G., Moreau, D., Roussakis, C., & Roussis, V. (2005). Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron Letters*, 46(34), 5723–5726. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.06.076>
- Kladi, M., Xenaki, H., Vagias, C., Papazafiri, P., & Roussis, V. (2006). New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron*, 62(1), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.09.113>
- Kladi, M., Vagias, C., Papazafiri, P., Furnari, G., Serio, D., & Roussis, V. (2007). New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron*, 63(32), 7606–7611. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.05.051>
- Komati, R., Spadoni, D., Zheng, S., Sridhar, J., Riley, K. E., & Wang, G. (2017). Ligands of Therapeutic Utility for the Liver X Receptors. *Molecules*, 22(1), 88–112. <https://doi.org/10.3390/molecules22010088>
- Kridel, S. J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N., & Smith, J. W. (2004). Orlistat Is a Novel Inhibitor of Fatty Acid Synthase with Antitumor Activity. *Cancer Research*, 64(6), 2070–2075. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3645>

- Krycer, J. R., Sharpe, L. J., Luu, W., & Brown, A. J. (2010). The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 21(5), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.001>
- Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2013). 3 - Algal lipids, fatty acids and sterols. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (pp. 87–134). Woodhead Publishing. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857095121500035>
- Laurencia J.V. Lamouroux, 1813, nom. cons.: Algaebase. (n.d.). Retrieved September 29, 2018, from http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=32789
- Lee, B. H., Taylor, M. G., Robinet, P., Smith, J. D., Schweitzer, J., Sehayek, E., Falzarano, S. M., Magi-Galluzzi, C., Klein, E. A., & Ting, A. H. (2013). Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. *Cancer Research*, 73(3), 1211–1218. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3128>
- Lhullier, C., Falkenberg, M., Ioannou, E., Quesada, A., Papazafiri, P., Horta, P. A., Schenkel, E. P., Vagias, C., & Roussis, V. (2010). Cytotoxic Halogenated Metabolites from the Brazilian Red Alga *Laurencia catarinensis*. *Journal of Natural Products*, 73(1), 27–32. <https://doi.org/10.1021/np900627r>
- Li, N., Xu, Y., Feng, T., Liu, C., Li, Y., Wang, X., & Si, S. (2014). Identification of a selective agonist for liver X receptor α (LXR α) via screening of a synthetic compound library. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(4), 566–574. <https://doi.org/10.1177/1087057113516004>
- Li, Xiancui, Fan, X., Han, L., & Lou, Q. (2002). Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry*, 59(2), 157–161. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00437-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00437-X)
- Li, Xiangyan, Chen, Y.-T., Hu, P., & Huang, W.-C. (2014). Fatostatin displays high antitumor activity in prostate cancer by blocking SREBP-regulated metabolic pathways and androgen receptor signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(4), 855–866. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0797>
- Li, Y. C., Park, M. J., Ye, S.-K., Kim, C.-W., & Kim, Y.-N. (2006). Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents. *The American Journal of Pathology*, 168(4), 1107–1118. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050959>
- Li, Y.-X., Li, Y., Qian, Z.-J., Ryu, B., & Kim, S. (2011). Suppression of vascular endothelial growth factor (VEGF) induced angiogenic responses by fucodiphloroethol G. *Process Biochemistry*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201600073860>

- Lin, C.-Y., & Gustafsson, J.-Å. (2015). Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, *15*(4), 216–224. <https://doi.org/10.1038/nrc3912>
- Liu, B., Wang, Y., Fillgrove, K. L., & Anderson, V. E. (2002). Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase *in vitro* and is cytotoxic to MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *49*(3), 187–193. <https://doi.org/10.1007/s00280-001-0399-x>
- Liu, C.-L., Lim, Y.-P., & Hu, M.-L. (2013). Fucoxanthin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via NFκB-mediated pathway and downregulates DNA repair gene expression in human hepatoma HepG2 cells. *Marine Drugs*, *11*(1), 50–66. <https://doi.org/10.3390/md11010050>
- Liu, Q., Luo, Q., Halim, A., & Song, G. (2017). Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Letters*, *401*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.002>
- Liu, X., Liu, W., Wang, L., Zhu, B., Shi, X., Peng, Z., & Ren, C. (2018). Roles of flotillins in tumors. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *19*(3), 171–182. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700102>
- Liu, X.-C., Gao, J.-M., Liu, S., Liu, L., Wang, J.-R., Qu, X.-J., Cai, B., & Wang, S.-L. (2015). Targeting apoptosis is the major battle field for killing cancers. *World Journal of Translational Medicine*, *4*(3), 69–77. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v4.i3.69>
- Lv, Y., Zhao, X., Zhu, L., Li, S., Xiao, Q., He, W., & Yin, L. (2018). Targeting intracellular MMPs efficiently inhibits tumor metastasis and angiogenesis. *Theranostics*, *8*(10), 2830–2845. <https://doi.org/10.7150/thno.23209>
- Ma, J., Fu, G., Wu, J., Han, S., Zhang, L., Yang, M., Yu, Y., Zhang, M., Lin, Y., & Wang, Y. (2016). 4-cholesten-3-one suppresses lung adenocarcinoma metastasis by regulating translocation of HMGB1, HIF1α and Caveolin-1. *Cell Death & Disease*, *7*(9), e2372. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.281>
- Mahdi, F., Falkenberg, M., Ioannou, E., Roussis, V., Zhou, Y.-D., & Nagle, D. G. (2011). Thyriferol Inhibits Mitochondrial Respiration and HIF-1 Activation. *Phytochemistry Letters*, *4*(2), 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.09.003>
- Man, W. C., Miyazaki, M., Chu, K., & Ntambi, J. M. (2006). Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(2), 1251–1260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508733200>
- Manríquez, C. P., Souto, M. L., Gavín, J. A., Norte, M., & Fernández, J. J. (2001). Several new squalene-derived triterpenes from *Laurencia*. *Tetrahedron*, *57*(15), 3117–3123. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00169-7)

- Márquez, D. C., Chen, H.-W., Curran, E. M., Welshons, W. V., & Pietras, R. J. (2006). Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *246*(1), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.020>
- Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Caveolae and signalling in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *15*(4), 225–237. <https://doi.org/10.1038/nrc3915>
- Maru, N., Ohno, O., Koyama, T., Yamada, K., & Uemura, D. (2010). Papillamide, a Novel Fatty Acid Amide from the Red Alga *Laurencia papillosa*. *Chemistry Letters*, *39*(4), 366–367.
- Matsuzawa, S., Kawamura, T., Mitsuhashi, S., Suzuki, T., Matsuo, Y., Suzuki, M., Mizuno, Y., & Kikuchi, K. (1999). Thyrsiferyl 23-acetate and its derivatives induce apoptosis in various T- and B-leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *7*(2), 381–387. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(98\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(98)00226-0)
- McDonnell, D. P., Park, S., Goulet, M. T., Jasper, J., Wardell, S. E., Chang, C.-Y., Norris, J. D., Guyton, J.R., & Nelson, E. R. (2014). Obesity, cholesterol metabolism, and breast cancer pathogenesis. *Cancer Research*, *74*(18), 4976–4982. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1756>
- Melo, T., Alves, E., Azevedo, V., Martins, A. S., Neves, B., Domingues, P., Calado, R., Abreu, M. H., & Domingues, M. R. (2015). Lipidomics as a new approach for the bioprospecting of marine macroalgae — Unraveling the polar lipid and fatty acid composition of *Chondrus crispus*. *Algal Research*, *8*(Supplement C), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.016>
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, *7*(10), 763–777. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>
- Men'shova, R. V., Ermakova, S. P., Rachidi, S. M., Al-Hajje, A. H., Zvyagintseva, T. N., & Kanaan, H. M. (2012). Seasonal variations of the composition, structural features, and antitumor properties of polysaccharides from *Padina pavonica* (Lebanon) as a function of composition. *Chemistry of Natural Compounds*, *47*(6), 870–875. <https://doi.org/10.1007/s10600-012-0091-x>
- Mohammed, K. A., Hossain, C. F., Zhang, L., Bruick, R. K., Zhou, Y.-D., & Nagle, D. G. (2004). Laurenditerpenol, a New Diterpene from the Tropical Marine Alga *Laurencia intricata* Potently Inhibits HIF-1 Mediated Hypoxic Signaling in Breast Tumor Cells. *Journal of Natural Products*, *67*(12), 2002–2007. <https://doi.org/10.1021/np049753f>
- Mollinedo, F., & Gajate, C. (2015). Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Advances in Biological Regulation*, *57*, 130–146. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.003>
- Monaco, M. E. (2017). Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, *8*(17), 29487–29500. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15494>

- Montalvão, S., Demirel, Z., Devi, P., Lombardi, V., Hongisto, V., Perälä, M., & Tammela, P. (2016). Large-scale bioprospecting of cyanobacteria, micro- and macroalgae from the Aegean Sea. *New Biotechnology*, *33*(3), 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.02.002>
- Moon, Y. A. (2017). The SCAP/SREBP Pathway: A Mediator of Hepatic Steatosis. *Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)*, *32*(1), 6–10. <https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.1.6>
- Morales-Amador, A., de Vera, C. R., Márquez-Fernández, O., Hernández Daranas, A., Padrón, J. M., Fernández, J. J., Souto, M. L., & Norte, M. (2017). Pinnatifidenyne-Derived Ethynyl Oxirane Acetogenins from *Laurencia viridis*. *Marine Drugs*, *16*(5). <https://doi.org/10.3390/md16010005>
- Moschetta, A. (2011). Nuclear Receptor LXR as a Novel Therapeutic Antitumoral Target in Glioblastoma. *Cancer Discovery*, *1*(5), 381–382. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0228>
- Mounier, C., Bouraoui, L., & Rassart, E. (2014). Lipogenesis in cancer progression (review). *International Journal of Oncology*, *45*(2), 485–492. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2441>
- Moussavou, G., Kwak, D. H., Obiang-Obonou, B. W., Ogandaga Maranguy, C. A., Dinzouna-Boutamba, S.-D., Lee, D. H., & Choo, Y. K. (2014). Anticancer Effects of Different Seaweeds on Human Colon and Breast Cancers. *Marine Drugs*, *12*(9), 4898–4911. <https://doi.org/10.3390/md12094898>
- Mullen, P. J., Yu, R., Longo, J., Archer, M. C., & Penn, L. Z. (2016). The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *16*(11), 718–731. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.76>
- Murad, H., Ghannam, A., Al-Ktaifani, M., Abbas, A., & Hawat, M. (2015). Algal sulfated carrageenan inhibits proliferation of MDA-MB-231 cells via apoptosis regulatory genes. *Molecular Medicine Reports*, *11*(3), 2153–2158.
- Murad, H., Hawat, M., Ekhtiar, A., Allapawe, A., Abbas, A., Darwish, H., Sbenati, O., & Ghannam, A. (2016). Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by sulfated polysaccharide extracted from *Laurencia papillosa*. *Cancer Cell International*, *16*, 39–50. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0315-4>
- Murai, T. (2015). Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biological Chemistry*, *396*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0194>
- Nelson, E. R., Wardell, S. E., Jasper, J. S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M. K., & McDonnell, D. P. (2013). 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6162), 1094–1098. <https://doi.org/10.1126/science.1241908>

- Newman, D. J. (2008). Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(9), 2589–2599. <https://doi.org/10.1021/jm0704090>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current “State of Play.” *Planta Medica*, 82(9–10), 775–789. <https://doi.org/10.1055/s-0042-101353>
- Nguyen-Vu, T., Vedin, L.-L., Liu, K., Jonsson, P., Lin, J. Z., Candelaria, N. R., & Lin, C.-Y. (2013). Liver \times receptor ligands disrupt breast cancer cell proliferation through an E2F-mediated mechanism. *Breast Cancer Research : BCR*, 15(3), R51. <https://doi.org/10.1186/bcr3443>
- Norte, M., Fernández, J., Souto, M. L., & García-Grávalos, M. D. (1996). Two new antitumoral polyether squalene derivatives. *Tetrahedron Letters*, 37(15), 2671–2674. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00357-7](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00357-7)
- Norte, M., Souto, M. L., & Fernández, J. J. (1996). Viridiols, Two New Diterpenes from *Laurencia viridis*. *Natural Product Letters*, 8(4), 263–269. <https://doi.org/10.1080/10575639608044905>
- Norte, M., Fernández, J., Souto, M. L., Gavín, J., & García-Grávalos, M. D. (1997). Thyrsenols A and B, two unusual polyether squalene derivatives. *Tetrahedron*, 53(9), 3173–3178. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00028-8)
- Oksana Belous, H. K. (2014). Diversity Investigation of the Seaweeds Growing on the Lebanese Coast. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2155-9910.1000156>
- Onodera, R., Motoyama, K., Okamatsu, A., Higashi, T., Kariya, R., Okada, S., & Arima, H. (2013). Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by methyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 452(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.071>
- O’Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H., & Gardiner, G. E. (2010). Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. *Marine Drugs*, 8(7), 2038–2064. <https://doi.org/10.3390/md8072038>
- Pan, L., Lezama-Davila, C. M., Isaac-Marquez, A. P., Calomeni, E. P., Fuchs, J. R., Satoskar, A. R., & Kinghorn, A. D. (2012). Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry*, 82, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.06.012>
- Pandyra, A., Mullen, P. J., Kalkat, M., Yu, R., Pong, J. T., Li, Z., & Penn, L. Z. (2014). Immediate utility of two approved agents to target both the metabolic mevalonate pathway and its restorative

- feedback loop. *Cancer Research*, 74(17), 4772–4782. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0130>
- Park, H.-K., Kim, I.-H., Kim, J., & Nam, T.-J. (2013). Induction of apoptosis and the regulation of ErbB signaling by laminarin in HT-29 human colon cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(2), 291–295. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1409>
- Park, S. J., & Jeon, Y. J. (2012). Dieckol from *Ecklonia cava* Suppresses the Migration and Invasion of HT1080 Cells by Inhibiting the Focal Adhesion Kinase Pathway Downstream of Rac1-ROS Signaling. *Molecules and Cells*, 33(2), 141–149. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-2192-6>
- Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizetto-Duarte, C., Polo, C., Rešek, E., Engelen, A., & Varela, J. (2012). Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Macroalgae: Potential for Nutritional and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, 10(9), 1920–1935. <https://doi.org/10.3390/md10091920>
- Pérez, M. J., Falqué, E., & Domínguez, H. (2016). Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/md14030052>
- Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146(3), 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
- Phan, L. M., Yeung, S.-C. J., & Lee, M.-H. (2014). Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biology & Medicine*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001>
- Pizer, E. S., Thupari, J., Han, W. F., Pinn, M. L., Chrest, F. J., Frehywot, G. L., Townsend, C. A., & Kuhajda, F. P. (2000). Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Research*, 60(2), 213–218.
- Pizer, E. S., Wood, F. D., Heine, H. S., Romantsev, F. E., Pasternack, G. R., & Kuhajda, F. P. (1996). Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Research*, 56(6), 1189–1193.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>

- Pommier, A. J. C., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., & Lobaccaro, J. M. A. (2010). Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene*, *29*(18), 2712–2723. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.30>
- Porstmann, T., Griffiths, B., Chung, Y.-L., Delpuech, O., Griffiths, J. R., Downward, J., & Schulze, A. (2005). PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene*, *24*(43), 6465–6481. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208802>
- Puig, T., Relat, J., Marrero, P. F., Haro, D., Brunet, J., & Colomer, R. (2008). Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals. *Anticancer Research*, *28*(6A), 3671–3676.
- Quinet, E. M., Basso, M. D., Halpern, A. R., Yates, D. W., Steffan, R. J., Clerin, V., & Vlasuk, G. P. (2009). LXR ligand lowers LDL cholesterol in primates, is lipid neutral in hamster, and reduces atherosclerosis in mouse. *Journal of Lipid Research*, *50*(12), 2358–2370. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900037-JLR200>
- Rashid, M. A., Gustafson, K. R., II, J. H. C., & Boyd, M. R. (1995). Brominated Chamigrane Sesquiterpenes Produce a Novel Profile of Differential Cytotoxicity in the NCI *in vitro* Screen. *Natural Product Letters*, *6*(4), 255–259. <https://doi.org/10.1080/10575639508043168>
- Reis-Sobreiro, M., Roué, G., Moros, A., Gajate, C., de la Iglesia-Vicente, J., Colomer, D., & Mollinedo, F. (2013). Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer Journal*, *3*(5), e118. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.15>
- Ricoult, S. J. H., Yecies, J. L., Ben-Sahra, I., & Manning, B. D. (2016). Oncogenic PI3K and K-Ras stimulate *de novo* lipid synthesis through mTORC1 and SREBP. *Oncogene*, *35*(10), 1250–1260. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.179>
- Rodrigues, D., Freitas, A. C., Pereira, L., Rocha-Santos, T. A. P., Vasconcelos, M. W., Roriz, M., Rodríguez-Alcalá, L. M., Gomes, A. M. P., & Duarte, A. C. (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chemistry*, *183*(Supplement C), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.057>
- Rough, J. J., Monroy, M. A., Yerrum, S., & Daly, J. M. (2010). Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *Journal of Ovarian Research*, *3*, 13. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-3-13>
- Ryu, G., SH, P., BW, C., NH, L., HJ, H., SY, R., & BH, L. (2002). Cytotoxic activities of brominated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia okamurai*, *8*(3), 103–107.

- Ryu, J., Hwang, H.-J., Kim, I.-H., & Nam, T.-J. (2012). Mechanism of Inhibition of HepG2 Cell Proliferation by a Glycoprotein from *Hizikia fusiformis*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(6), 553–560. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2012.0553>
- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from *in vivo* competition studies. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5785–5793.
- Sánchez, C. A., Rodríguez, E., Varela, E., Zapata, E., Páez, A., Massó, F. A., Montañó, L. F., & Lóopez-Marure, R. (2008). Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress. *Cancer Investigation*, 26(7), 698–707. <https://doi.org/10.1080/07357900701874658>
- Sanina, N. M., Goncharova, S. N., & Kostetsky, E. Y. (2004). Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes. *Phytochemistry*, 65(6), 721–730. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.01.013>
- Santos, C. R., & Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *The FEBS Journal*, 279(15), 2610–2623. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x>
- Sarker, S. D. (Ed.). (2005). *Natural Products Isolation* (2nd ed.). Humana Press. Retrieved from [//www.springer.com/us/book/9781592599554](http://www.springer.com/us/book/9781592599554)
- Scheuer, P. J. (2013). *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*. Academic Press.
- Schimanski, S., Wild, P. J., Treeck, O., Horn, F., Siguener, A., Rudolph, C., & Schmitz, G. (2010). Expression of the lipid transporters ABCA3 and ABCA1 is diminished in human breast cancer tissue. *Hormone and Metabolic Research*, 42(2), 102–109. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241859>
- Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., & Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development*, 14(22), 2831–2838.
- Sebaaly, C., Karaki, N., Chahine, N., Evidente, A., Yassine, A., Habib, J., & Kanaan, H. (2012). Polysaccharides of the red algae '*Pterocladia*' growing on the Lebanese coast: Isolation, structural features with antioxidant and anticoagulant activities., 2(10), 01–010.
- Sebaaly, C., Kassem, S., Grishina, E., Kanaan, H., Sweidan, A., Chmit, M. S., & Kanaan, H. M. (2014). Anticoagulant and antibacterial activities of polysaccharides of red algae *Corallina* collected from Lebanese coast. [Http://Www.Japsonline.Com/Counter.php?Aid=1223](http://www.japsonline.com/Counter.php?Aid=1223), 4(04), 030–037.

- Sinilnikova, O. M., Ginolhac, S. M., Magnard, C., Léoné, M., Anczukow, O., Hughes, D., & Lenoir, G. M. (2004). Acetyl-CoA carboxylase α gene and breast cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, *25*(12), 2417–2424. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh273>
- Smit, A. J. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, *16*(4), 245–262. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047783.36600.ef>
- Smith, B., & Land, H. (2012). Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene. *Cell Reports*, *2*(3), 580–590. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.011>
- Sokolova, R. V., Ermakova, S. P., Awada, S. M., Zvyagintseva, T. N., & Kanaan, H. M. (2011). Composition, structural characteristics, and antitumor properties of polysaccharides from the brown algae *Dictyopteris polypodioides* and *Sargassum* sp. *Chemistry of Natural Compounds*, *47*(3), 329. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9925-1>
- Stadler, S. C., Hacker, U., & Burkhardt, R. (2016). Cholesterol metabolism and breast cancer. *Current Opinion in Lipidology*, *27*(2), 200. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000285>
- Staubach, S., & Hanisch, F.-G. (2011). Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Review of Proteomics*, *8*(2), 263–277. <https://doi.org/10.1586/epr.11.2>
- Stengel, D. B., Connan, S., & Popper, Z. A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, *29*(5), 483–501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.016>
- Sun, J., Shi, D., Ma, M., Li, S., Wang, S., Han, L., Yang, Y., Fan, X., Shi, J., & He, L. (2005). Sesquiterpenes from the red alga *Laurencia tristicha*. *Journal of Natural Products*, *68*(6), 915–919. <https://doi.org/10.1021/np050096g>
- Sun, J., Shi, D.-Y., Li, S., Wang, S.-J., Han, L.-J., Fan, X., Yang, Y.-C., & Shi, J.-G. (2007). Chemical constituents of the red alga *Laurencia tristicha*. *Journal of Asian Natural Products Research*, *9*(6–8), 725–734. <https://doi.org/10.1080/10286020601103338>
- Sun, W.-S., Su, S., Zhu, R.-X., Tu, G.-Z., Cheng, W., Liang, H., Guo, X.-Y., Zhao, Y.-Y., & Zhang, Q.-Y. (2013). A pair of unprecedented spiro-trisindole enantiomers fused through a five-member ring from *Laurencia similis*. *Tetrahedron Letters*, *54*(28), 3617–3620. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.04.111>
- Suzuki, M., Kurosawa, E., & Kurata, K. (1987). (E)-2-Tridecyl-2-heptadecenal, an Unusual Metabolite from the Red Alga *Laurencia* Species. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *60*(10), 3793–3794. <https://doi.org/10.1246/bcsj.60.3793>

- Suzuki, M., Matsuo, Y., Takahashi, Y., & Masuda, M. (1995). Callicladol, a Novel Cytotoxic Bromotriterpene Polyether from a Vietnamese Species of the Red Algal Genus *Laurencia*. *Chemistry Letters*, 1995(11), 1045–1046. <https://doi.org/10.1246/cl.1995.1045>
- Suzuki, T., Suzuki, M., Furusaki, A., Matsumoto, T., Kato, A., Imanaka, Y., & Kurosawa, E. (1985). Teurilene and thyriferyl 23-acetate, meso and remarkably cytotoxic compounds from the marine red alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Tetrahedron Letters*, 26(10), 1329–1332. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)94885-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)94885-8)
- Suzuki, T., Takeda, S., Hayama, N., Tanaka, I., & Komiyama, K. (1989). The Structure of Brominated Diterpene from the Marine Red Alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Chemistry Letters*, 18(6), 969–970. <https://doi.org/10.1246/cl.1989.969>
- Suzuki, T., Takeda, S., Suzuki, M., Kurosawa, E., Kato, A., & Imanaka, Y. (1987). Cytotoxic Squalene-Derived Polyethers from the Marine Red Alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Chemistry Letters*, 16(2), 361–364. <https://doi.org/10.1246/cl.1987.361>
- Takeda, S., Kurosawa, E., Komiyama, K., & Suzuki, T. (1990). The Structures of Cytotoxic Diterpenes Containing Bromine from the Marine Red Alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 63(11), 3066–3072. <https://doi.org/10.1246/bcsj.63.3066>
- Takeda, S., Matsumoto, T., Komiyama, K., Kurosawa, E., & Suzuki, T. (1990). A New Cytotoxic Diterpene from the Marine Red Alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Chemistry Letters*, 19(2), 277–280. <https://doi.org/10.1246/cl.1990.277>
- Tang, J.-J., Li, J.-G., Qi, W., Qiu, W.-W., Li, P.-S., Li, B.-L., & Song, B.-L. (2011). Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metabolism*, 13(1), 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.004>
- Tannoury, M., Saab, A., Elia, J., N Harb, N., Makhoulouf, H., & Diab, M. (2017). *In vitro* Cytotoxic Activity of *Laurencia papillosa*, Marine Red Algae from the Lebanese Coast, 7, 175–179. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70328>
- Tasende, M. G. (2000). Fatty acid and sterol composition of gametophytes and sporophytes of *Chondrus crispus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Scientia Marina*, 64(4), 421–426. <https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n4421>
- Tawfike, A. F., Abbott, G., Young, L., & Edrada-Ebel, R. (2018). Metabolomic-Guided Isolation of Bioactive Natural Products from *Curvularia* sp., an Endophytic Fungus of *Terminalia laxiflora*. *Planta Medica*, 84(3), 182–190. <https://doi.org/10.1055/s-0043-118807>

- Teas, J., Vena, S., Cone, D. L., & Irhimeh, M. (2013). The consumption of seaweed as a protective factor in the etiology of breast cancer: proof of principle. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 771–779. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9931-0>
- Topcu, G., Aydogmus, Z., Imre, S., Gören, A. C., Pezzuto, J. M., Clement, J. A., & Kingston, D. G. I. (2003). Brominated Sesquiterpenes from the Red Alga *Laurencia obtusa*. *Journal of Natural Products*, 66(11), 1505–1508. <https://doi.org/10.1021/np030176p>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Trevor, R., Pettitt, A., Jones, L., & Harwood, J. L. (1989). Lipids of the marine red algae, *Chondrus crispus* and *Polysiphonia lanosa*. *Phytochemistry*, 28(2), 399–405. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80020-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80020-2)
- Tsai, C.-J., & Sun Pan, B. (2012). Identification of sulfoglycolipid bioactivities and characteristic fatty acids of marine macroalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(34), 8404–8410. <https://doi.org/10.1021/jf302241d>
- Turashvili, G., & Brogi, E. (2017). Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Frontiers in Medicine*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00227>
- Tvrzicka, E., Kremmyda, L.-S., Stankova, B., & Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 155(2), 117–130.
- Vairappan, C. S., Suzuki, M., Ishii, T., Okino, T., Abe, T., & Masuda, M. (2008). Antibacterial activity of halogenated sesquiterpenes from Malaysian *Laurencia* spp. *Phytochemistry*, 69(13), 2490–2494. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.06.015>
- Van de Sande, T., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2002). Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research*, 62(3), 642–646.
- van Ginneken, V. J., Helsper, J. P., de Visser, W., van Keulen, H., & Brandenburg, W. A. (2011). Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in Health and Disease*, 10, 104. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-104>
- Vaskovsky, V. E., Khotimchenko, S. V., Bangmei Xia, & Li Hefang. (1996). Polar lipids and fatty acids of some marine macrophytes from the yellow sea. *Phytochemistry*, 42(5), 1347–1356. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00117-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00117-3)

- Vedin, L.-L., Lewandowski, S. A., Parini, P., Gustafsson, J.-A., & Steffensen, K. R. (2009). The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, *30*(4), 575–579. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp029>
- Velosaotsy, N. E. (2005). *Etude de lipides d'éponges marines – phospholipides, acides gras, stérols : identification et évaluation pharmacologique de métabolites secondaires* (Thèse de doctorat). Université de Nantes. <http://www.sudoc.abes.fr/xslt/DB=2.1//SRCH?IKT=12&TRM=091294061&COOKIE=U10178,Klecteurweb,I250,B341720009+,SY,NLECTEUR+WEBOPC,D2.1,E3947d1a2-c45,A,H,R46.193.65.104,FY>
- Venugopal, V. (2008). *Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean*. CRC Press.
- von Roemeling, C. A., Marlow, L. A., Wei, J. J., Cooper, S. J., Caulfield, T. R., Wu, K., Tan, W. W., Tun, H. W., & Copland, J. A. (2013). Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *19*(9), 2368–2380. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3249>
- Wang, B., & Tontonoz, P. (2018). Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, *14*(8), 452. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0037-x>
- Wang, C., Xu, C., Sun, M., Luo, D., Liao, D., & Cao, D. (2009). Acetyl-CoA Carboxylase- α Inhibitor TOFA Induces Human Cancer Cell Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *385*(3), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.045>
- Wang, X., Yang, Q., Guo, L., Li, X.-H., Zhao, X.-H., Song, L.-B., & Lin, H.-X. (2013). Flotillin-2 is associated with breast cancer progression and poor survival outcomes. *Journal of Translational Medicine*, *11*, 190. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-190>
- Wang, Y., Rogers, P. M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K. R., & Burris, T. P. (2008). Regulation of Cholesterologenesis by the Oxysterol Receptor, LXR α . *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(39), 26332–26339. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804808200>
- WHO | Breast cancer. (n.d.). Retrieved September 22, 2018, from <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
- Wielgosz-Collin, G., Kendel, M., & Couzinet-Mossion, A. (2016). Chapter 7 - Lipids, Fatty Acids, Glycolipids, and Phospholipids. In *Seaweed in Health and Disease Prevention* (pp. 185–221). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00007-5>

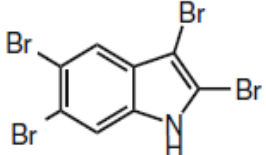
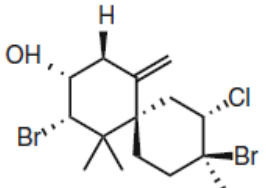
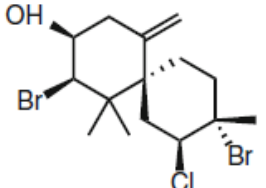
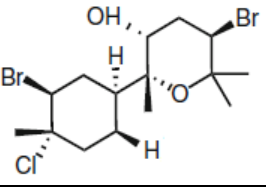
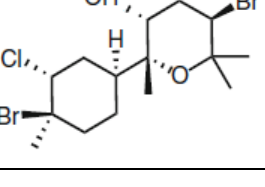
- Williams, D. E., Sturgeon, C. M., Roberge, M., & Andersen, R. J. (2007). Nigricanosides A and B, Antimitotic Glycolipids Isolated from the Green Alga *Avrainvillea nigricans* Collected in Dominica. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(18), 5822–5823. <https://doi.org/10.1021/ja0715187>
- Wong, J., Quinn, C. M., & Brown, A. J. (2006). SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochemical Journal*, *400*(Pt 3), 485–491. <https://doi.org/10.1042/BJ20060914>
- Wright, A. D., König, G. M., Angerhofer, C. K., Greenidge, P., Linden, A., & Desqueyroux-Faúndez, R. (1996). Antimalarial Activity: The Search for Marine-Derived Natural Products with Selective Antimalarial Activity. *Journal of Natural Products*, *59*(7), 710–716. <https://doi.org/10.1021/np9602325>
- Xie, G., Xie, G., Li, J., Li, J., Chen, J., Chen, J., & Liao, C. (2015). Knockdown of flotillin-2 impairs the proliferation of breast cancer cells through modulation of Akt/FOXO signaling. *Oncology Reports*, *33*(5), 2285–2290. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3826>
- Xiong, T., Xu, G., Huang, X.-L., Lu, K.-Q., Xie, W.-Q., Yin, K., & Tu, J. (2018). ATP-binding cassette transporter A1: A promising therapy target for prostate cancer. *Molecular and Clinical Oncology*, *8*(1), 9–14. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1506>
- Xu, X. H., & Su, J. Y. (1997). A new cytotoxic dihydroxy sterol from *Laurencia majuscula*. *Chinese Chemical Letters*, *8*(3), 235–236.
- Xu, Z.-X., Ding, T., Haridas, V., Connolly, F., & Gutterman, J. U. (2009). Avicin D, a plant triterpenoid, induces cell apoptosis by recruitment of Fas and downstream signaling molecules into lipid rafts. *PLoS One*, *4*(12), e8532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008532>
- Yang, L., Wang, P., Wang, H., Li, Q., Teng, H., Liu, Z., Yang, W., Hou, L., & Zou, X. (2013). Fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway. *Marine Drugs*, *11*(6), 1961–1976. <https://doi.org/10.3390/md11061961>
- Yang, Y. u-An, Morin, P. J., Han, W. F., Chen, T., Bornman, D. M., Gabrielson, E. W., & Pizer, E. S. (2003). Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c. *Experimental Cell Research*, *282*(2), 132–137.
- Yende, S. R., Harle, U. N., & Chaugule, B. B. (2014). Therapeutic potential and health benefits of Sargassum species. *Pharmacognosy Reviews*, *8*(15), 1–7. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125514>

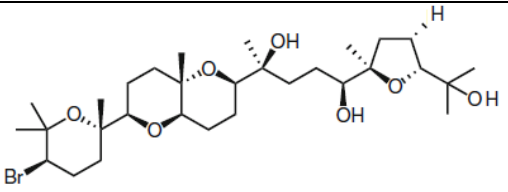
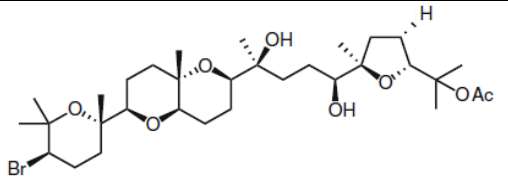
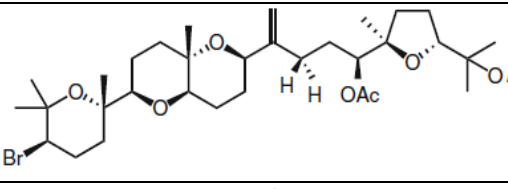
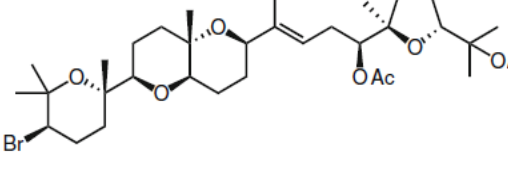
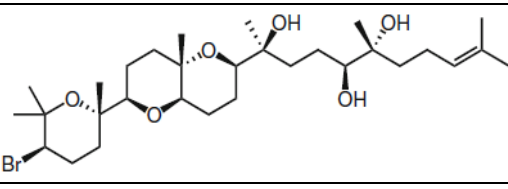
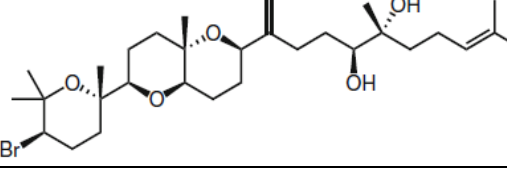
- Yoon, S., Lee, M.-Y., Park, S. W., Moon, J.-S., Koh, Y.-K., Ahn, Y.-H., Park, B.-W., & Kim, K.-S. (2007). Up-regulation of Acetyl-CoA Carboxylase α and Fatty Acid Synthase by Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 at the Translational Level in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26122–26131. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702854200>
- Yu, X. Q., Jiang, C. S., Zhang, Y., Sun, P., Kurtán, T., Mándi, A., & Mao, S. C. (2017). Compositacins A–K: Bioactive chamigrane-type halosesquiterpenoids from the red alga *Laurencia composita* Yamada. *Phytochemistry*, 136, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.007>
- Yu, X.-Q., He, W.-F., Liu, D.-Q., Feng, M.-T., Fang, Y., Wang, B., Feng, L.-H., Guo, Y.-W., & Mao, S.-C. (2014). A seco-laurane sesquiterpene and related laurane derivatives from the red alga *Laurencia okamurai* Yamada. *Phytochemistry*, 103, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.021>
- Yuliana, N. D., Khatib, A., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2011). Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research*, 25(2), 157–169. <https://doi.org/10.1002/ptr.3258>
- Yunoki, K., Sato, M., Seki, K., Ohkubo, T., Tanaka, Y., & Ohnishi, M. (2009). Simultaneous quantification of plant glyceroglycolipids including sulfoquinovosyldiacylglycerol by HPLC-ELSD with binary gradient elution. *Lipids*, 44(1), 77–83. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3248-4>
- Zaleta-Pinet, D. A., Holland, I. P., Muñoz-Ochoa, M., Murillo-Alvarez, J. I., Sakoff, J. A., van Altena, I. A., & McCluskey, A. (2014). Cytotoxic compounds from *Laurencia pacifica*. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 4(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13588-014-0008-8>
- Zerrifi, S. E. A., El Khalloufi, F., Oudra, B., & Vasconcelos, V. (2018). Seaweed Bioactive Compounds against Pathogens and Microalgae: Potential Uses on Pharmacology and Harmful Algae Bloom Control. *Marine Drugs*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/md16020055>
- Zhao, J., Zhi, Z., Wang, C., Xing, H., Song, G., Yu, X., Zhu, Y., Wang, X., Zhang, X., & Di, Y. (2017). Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. *Oncology Reports*, 38(4), 2105–2115. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5864>
- Zhao, L., Shi, M., Duan, J., Ma, H., Wu, Z., Chen, X., Yang, T., & Liao, W. (2014). Flotillin-2 role in nasopharyngeal carcinoma metastasis and correlation with poor survival outcomes. *Journal of Clinical Oncology*, 32(15_suppl), e17050–e17050. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.e17050
- Zhu, Y.-Z., Liu, J.-W., Wang, X., Jeong, I.-H., Ahn, Y.-J., & Zhang, C.-J. (2018). Anti-BACE1 and Antimicrobial Activities of Steroidal Compounds Isolated from Marine *Urechis unicinctus*. *Marine Drugs*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/md16030094>

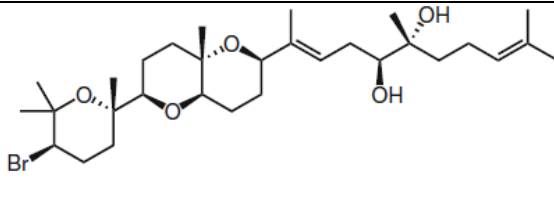
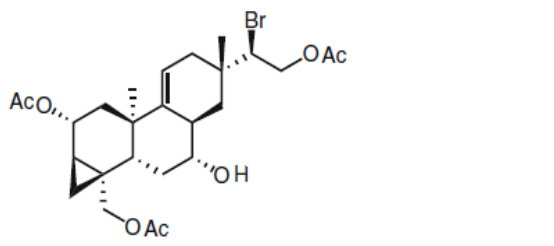
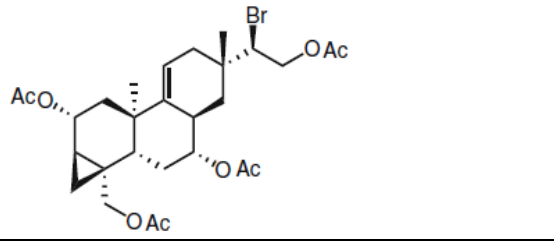
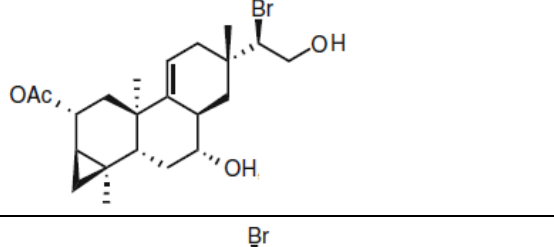
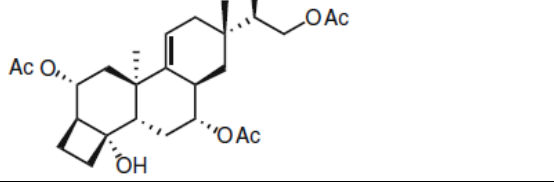
Zhuang, L., Lin, J., Lu, M. L., Solomon, K. R., & Freeman, M. R. (2002). Cholesterol-rich Lipid Rafts Mediate Akt-regulated Survival in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 62(8), 2227–2231.

Annexes

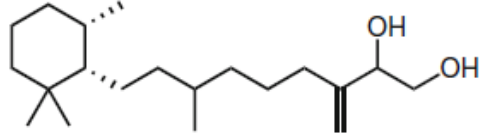
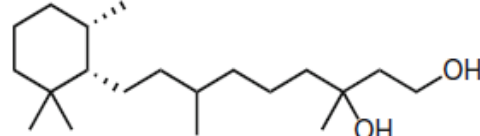
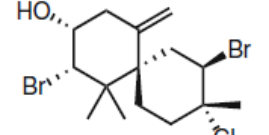
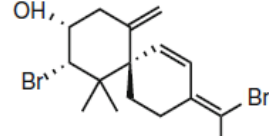
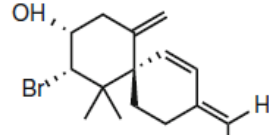
Annexe 1. Métabolites cytotoxiques des macroalgues marines du genre *Laurencia*

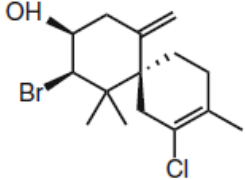
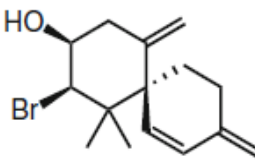
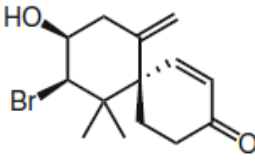
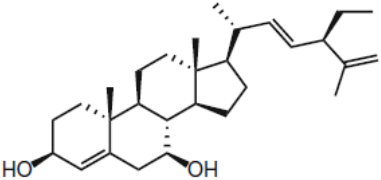
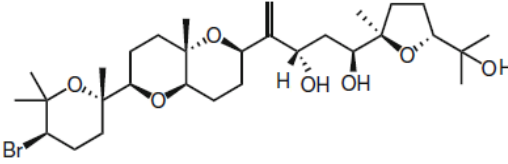
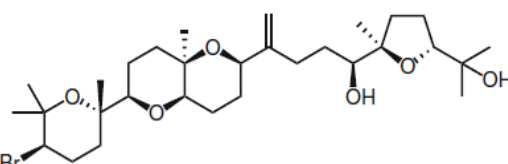
Espèce de <i>Laurencia</i>	Site de collecte	Composé	Structure	Masse moléculaire	Classe chimique	Lignées cellulaires cancéreuses ciblées	Références
<i>L. brongniartii</i>	Caraïbes	2,3,5,6-tetrabromo-indole		432,735 [M] ⁺	Alcaloïde indolique	L-1210 (ID ₅₀ de 3,6 µg/mL)	(Carter <i>et al.</i> 1978)
<i>L. obtusa</i>	Côte nord de Tenerife	Obtusol		414,606 [M] ⁺	Sesquiterpène	HeLa-229 (ID ₅₀ de 50 µg/mL)	(González, Darias, and Estévez 1982)
		Isoobtusol		414,607 [M] ⁺	Sesquiterpène	HeLa-229 (ID ₅₀ de 10 µg/mL)	
		Caespitol		432,622 [M] ⁺	Sesquiterpène	HeLa-229 (ID ₅₀ de 100 µg/mL)	
<i>L. caespitosa</i>	Côte nord de Tenerife	Isocaespitol		432,622 [M] ⁺	Sesquiterpène	HeLa-229 (ID ₅₀ de 50 µg/mL)	

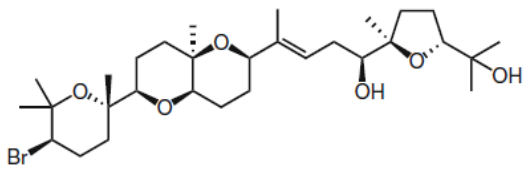
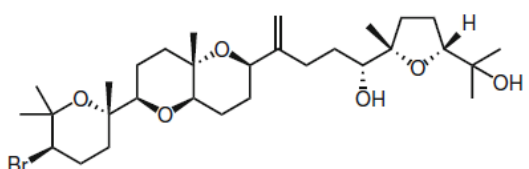
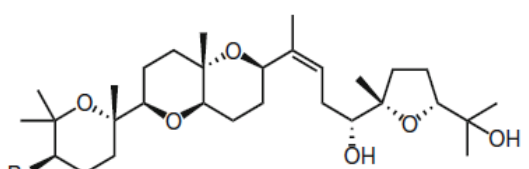
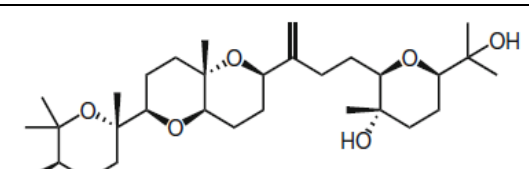
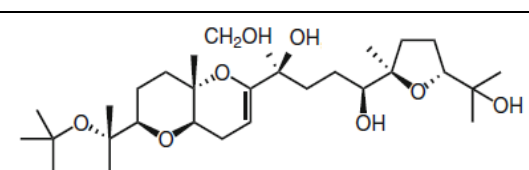
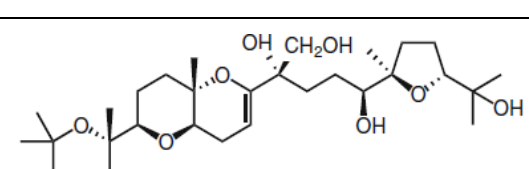
<i>L. obtusa</i>	Japon	Thyrsiferol		605,648 [M] ⁺	Triterpène	P388 (ED ₅₀ de 0,3 ng/mL)	(Suzuki <i>et al.</i> 1985)
		Thyrsiferyl 23-acetate		630,2887 [M - H ₂ O] ⁺	Triterpène	P388 (ED ₅₀ de 10 ng/mL)	(Suzuki <i>et al.</i> 1985)
		15(28)- anhydrothyrsiferyl diacetate		670,3064 [M] ⁺	Triterpène	P388 (ED ₅₀ de 50 ng/mL)	(Suzuki <i>et al.</i> 1987)
		15-anhydrothyrsiferyl diacetate		671,708 [M] ⁺	Triterpène	P388 (ED ₅₀ de 100 ng/mL)	(Suzuki <i>et al.</i> 1987)
		Magireol A		552,2834 [M - 2H ₂ O] ⁺	Triterpène	P388 (ED ₅₀ de 30 ng/mL)	(Suzuki <i>et al.</i> 1987)
		Magireol B		570,2915 [M] ⁺	Triterpène	P388 (ED ₅₀ de 30 ng/mL)	(Suzuki <i>et al.</i> 1987)

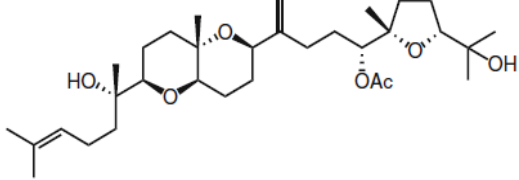
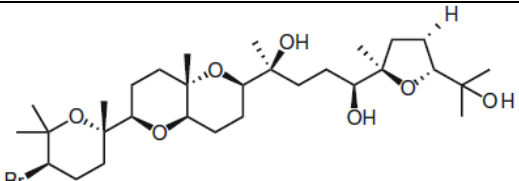
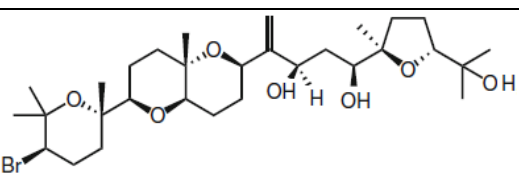
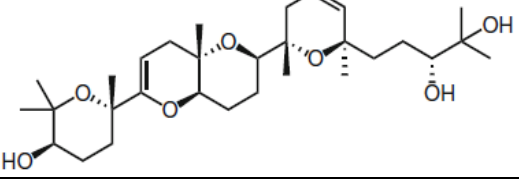
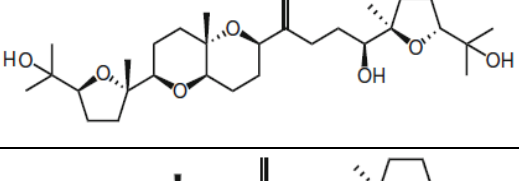
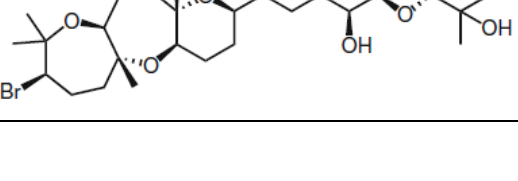
		Magireol C		571,634 [M] ⁺	Triterpène	P388 (ED ₅₀ de 30 ng/mL)	(Suzuki <i>et al.</i> 1987)
<i>L. saitoi</i>	Japon	Parguerol 16,19- diacetate		524,1622 [M - H ₂ O] ⁺	Diterpène	HeLa (Cl ₅₀ de 3,1 µg/mL) P388 (3,5 µg/mL)	(Takeda, Kurosawa, <i>et al.</i> 1990)
		Parguerol triacetate		444,2528 [M - AcOH] ⁺	Diterpène	HeLa (Cl ₅₀ de 6,3 µg/mL) P388 (8,5 µg/mL)	(Takeda, Kurosawa, <i>et al.</i> 1990 ; Suzuki <i>et al.</i> 1989)
		Deoxyparguerol		441,404 [M] ⁺	Diterpène	HeLa (Cl ₅₀ de 0,3 µg/mL) P388 (1,1 µg/mL)	(Takeda, Kurosawa, <i>et al.</i> 1990)
		Isoparguerol 7,16- diacetate		541,478 [M] ⁺	Diterpène	HeLa (Cl ₅₀ de 6,3 µg/mL) P388 (9,9 µg/mL)	(Takeda, Kurosawa, <i>et al.</i> 1990)

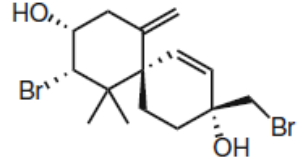
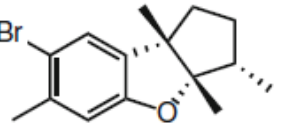
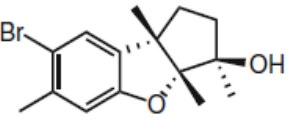
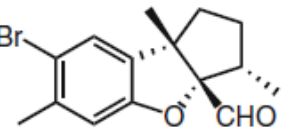
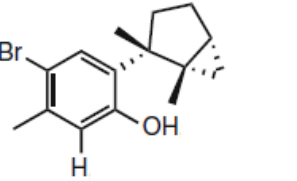
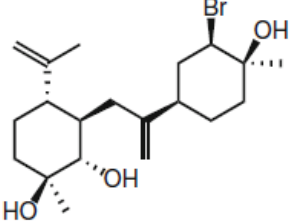
		2-acetoxy-15-bromo-7,16-dihydroxy-3-palmitoxy-neoparguera-4(19),9(11)-diene		695,816 [M] ⁺	Diterpène	HeLa (CI ₅₀ de 25 µg/mL) P388 (25 µg/mL) B-16 (0,78 µg/mL)	(Takeda, Kurosawa, <i>et al.</i> 1990 ; Takeda, Matsumoto, <i>et al.</i> 1990)
<i>L. majuscula</i>	Nord-est de l'Australie	(Z)-10,15-dibromo-9-hydroxychamigra-1,3(15),7(14)-triene		376,13 [M] ⁺	Sesquiterpène	NCI-60	(Rashid <i>et al.</i> 1995)
		(E)-10,15-dibromo-9-hydroxychamigra-1,3(15),7(14)-triene		376,13 [M] ⁺	Sesquiterpène	NCI-60	
		Isoobtusadiene		297,234 [M] ⁺	Sesquiterpène	NCI-60	
<i>L. majuscula</i>	Philippine	Majapolene A		330,0823 [M] ⁺	Sesquiterpène	NCI 60 (GI ₅₀ de 0,4 µM ; TGI de 0,9 µM ; LC ₅₀ de 2,8 µM)	(Erickson <i>et al.</i> 1995)
<i>L. calliclada</i>	Vietnam	Callicladol		603,633 [M] ⁺	Triterpène	P388	(SUZUKI <i>et al.</i> 1995)

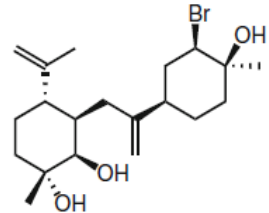
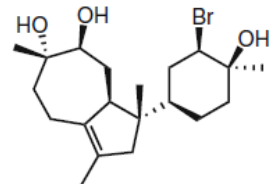
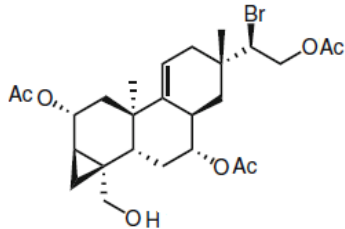
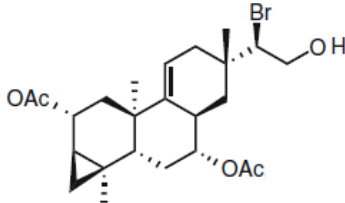
<i>L. viridis</i>	ÎlesCanaries	Viridiol A		310,519 [M] ⁺	Diterpène	P388 (Cl ₅₀ de 1 µg/mL) A-549 (2,5 µg/mL) HT-29 (2,5 µg/mL) MEL-28 (2,5 µg/mL)	(Norte, Souto, and Fernández 1996)
		Viridiol B		312,535 [M] ⁺	Diterpène	P388 (Cl ₅₀ de 1 µg/mL) A-549 (2,5 µg/mL) HT-29 (2,5 µg/mL) MEL-28 (2,5 µg/mL)	
<i>L. cartilaginea</i>	Hawaï	Cartilagineol		414,607 [M] ⁺	Sesquiterpène	P388 (Cl ₅₀ de 5 µg/mL) A-549 (1 µg/mL) HT-29 (0,25 µg/mL) MEL-28 (1 µg/mL)	(Juagdan, Kalidindi, and Scheuer 1997)
		(Z)-10,15-dibromo-9-hydroxychamigra-1,3(15),7(14)-triene		376,13 [M] ⁺	Sesquiterpène	P388 (Cl ₅₀ de 1 µg/mL) A-549 (1 µg/mL) HT-29 (0,025 µg/mL) MEL-28 (1 µg/mL)	
		(E)-10,15-dibromo-9-hydroxychamigra-1,3(15),7(14)-triene		376,13 [M] ⁺	Sesquiterpène	P388 (Cl ₅₀ de 1 µg/mL) A-549 (1 µg/mL) HT-29 (0,025 µg/mL) MEL-28 (1 µg/mL)	

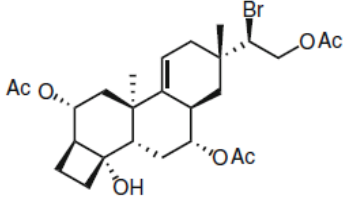
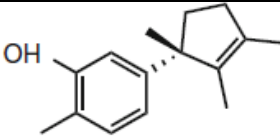
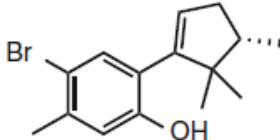
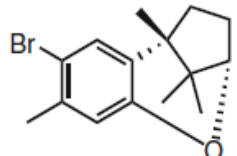
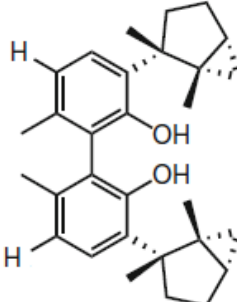
		Elatol		332,0540 [M] ⁺	Sesquiterpène	P388 (Cl ₅₀ de 1 µg/mL) A-549 (0,1 µg/mL) HT-29 (0,1 µg/mL) MEL-28 (0,1 µg/mL)	
		Isoobtusadiene		297,234 [M] ⁺	Sesquiterpène	P388 (Cl ₅₀ de 1 µg/mL) A-549 (1 µg/mL) HT-29 (0,25 µg/mL) MEL-28 (1 µg/mL)	
		Ma'ilione		299,207 [M] ⁺	Sesquiterpène	P388 (Cl ₅₀ de 5 µg/mL) A-549 (5 µg/mL) HT-29 (0,5 µg/mL) MEL-28 (10 µg/mL)	
<i>L. majuscula</i>	Mer de Chine méridionale	(24S)-stigmasta-4,25-diene-3β,6β-diol		428,697 [M] ⁺	Stéroïde	P388 (Cl ₅₀ de 1,2 µg/mL)	(Xu and Su 1997)
<i>L. viridis</i>	Îles Canaries	16-hydroxy-dehydrothysiferol		603,633 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,5 µg/mL) A-549 (1,2 µg/mL) HT-29 (1,2 µg/mL) MEL-28 (1,2 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998)
		10-epi-dehydrothysiferol		587,633 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 1 µg/mL) A-549 (5 µg/mL) HT-29 (5 µg/mL) MEL-28 (5 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998 ; Norte <i>et al.</i> 1996)

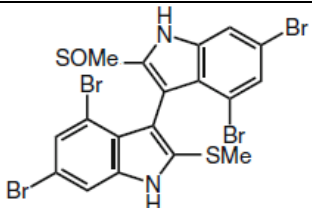
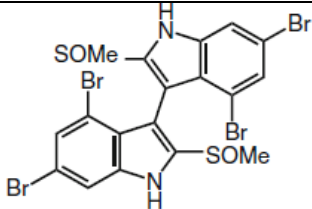
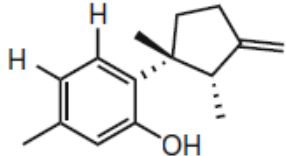
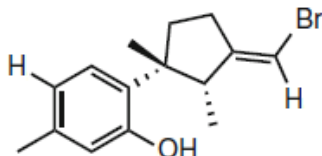
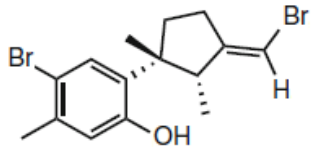
		10-epi-15,16-dehydrothysiferol		587,633 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,5 µg/mL) A-549 (2,5 µg/mL) HT-29 (1,2 µg/mL) MEL-28 (2,5 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998)
		Dehydrovenustatriol		587,633 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,01 µg/mL) A-549 (2,5 µg/mL) HT-29 (2,5 µg/mL) MEL-28 (2,5 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998)
		15,16-dehydrovenustatriol		587,633 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,25 µg/mL) A-549 (2,5 µg/mL) HT-29 (2,5 µg/mL) MEL-28 (2,5 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998)
		Isodehydrothysiferol		587,633 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,01 µg/mL) A-549 (2,5 µg/mL) HT-29 (2,5 µg/mL) MEL-28 (2,5 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998 ; Norte <i>et al.</i> 1996)
		Thyrsenol A		619,632 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,25 µg/mL) A-549 (2,5 µg/mL) HT-29 (2,5 µg/mL) MEL-28 (5 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998 ; Norte <i>et al.</i> 1997)
		Thyrsenol B		619,632 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,01 µg/mL) A-549 (>1 µg/mL) HT-29 (>1 µg/mL) MEL-28 (>1 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998 ; Norte <i>et al.</i> 1997)

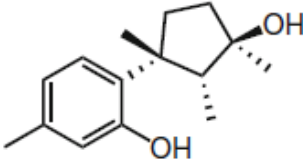
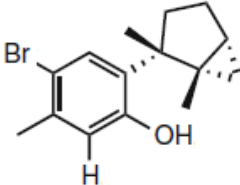
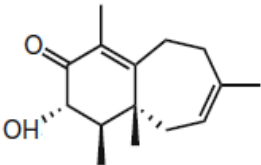
		Predehydrovenustatriol acetate		550,774 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 1,2 µg/mL) A-549 (2,5 µg/mL) HT-29 (5 µg/mL) MEL-28 (2,5 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998)
<i>L. viridis</i>	Îles Canaries	Thyrsiferol		605,648 [M] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,01 µg/mL) A549 (10 µg/mL) HT29 (10 µg/mL)	(Fernández, Souto, and Norte 1998)
<i>L. viridis</i>	Îles Canaries	16-epi-hydroxy-dehydrothyrsiferol		603,633 [M] ⁺	Triterpène	P388 A-549 HT-29 MEL-28	(Manríquez <i>et al.</i> 2001)
		Martiriol		522,721 [M] ⁺	Triterpène	P388 A-549 HT-29 MEL-28	
		Pseudodehydrothyrsiferol		524,737 [M] ⁺	Triterpène	P388 A-549 HT-29 MEL-28	
		Dioxepandehydrothyrsiferol		587,633 [M] ⁺	Triterpène	P388 A-549 HT-29 MEL-28	

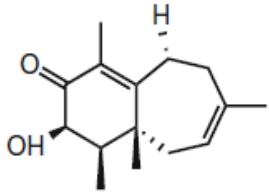
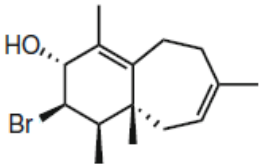
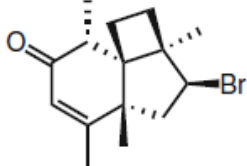
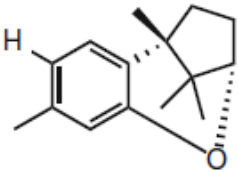
<i>Laurencia</i> sp.	Philippines	Ma'iliohydrin		473,042 [M] ⁺	Sesquiterpène	NCI-60 (GI ₅₀ de 10 ⁻⁵ M)	(Francisco and Erickson 2001)
<i>L. okamurai</i>	Corée	Aplysin		295,218 [M] ⁺	Sesquiterpène	A-549 SK-OV-3 SK-MEL-2 XF-498 HT-15	(Ryu <i>et al.</i> 2002)
		10-hydroxy-aplysin		311,218 [M] ⁺	Sesquiterpène	A-549 SK-OV-3 SK-MEL-2 XF-498 HT-15	
		Aplysinal		309,202 [M] ⁺	Sesquiterpène	A-549 SK-OV-3 SK-MEL-2 XF-498 HT-15	
		Laurinterol		295,218 [M] ⁺	Sesquiterpène	A-549 SK-OV-3 SK-MEL-2 XF-498 HT-15	
<i>L. obtusa</i>	Mer Ionienne	Prevezol B		401,383 [M] ⁺	Diterpène	MCF-7 (CI ₅₀ de 135,6 µM) PC3 (80,4 µM) HeLa (78 µM) A431 (65,2 µM)	(Iliopoulou <i>et al.</i> 2003)

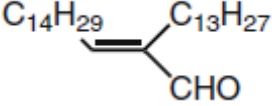
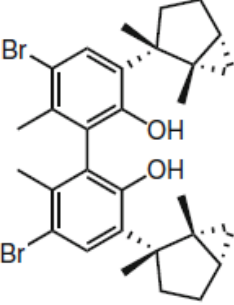
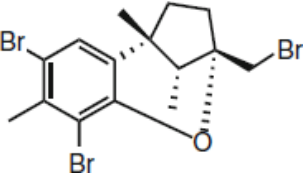
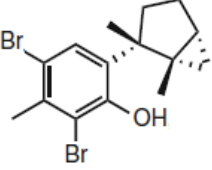
						K562 (76,4 µM)	
		Prevezol C		401,383 [M] ⁺	Diterpène	MCF-7 (CI ₅₀ de 140,5 µM) PC3 (158,8 µM) HeLa (80,5 µM) A431 (78,4 µM) K562 (123,5 µM)	
		Prevezol D		401,383 [M] ⁺	Diterpène	MCF-7 (CI ₅₀ >200 µM) PC3 (>200 µM) HeLa (120,6 µM) A431 (135,5 µM) K562 (156,9 µM)	
<i>L. filiformis</i>	Sud de l'Australie	Parguerol 7,16-diacetate		541,478 [M] ⁺	Diterpène	90% d'inhibition de la viabilité des cellules tumorales du carcinome d'Ehrlich à 50 et 100 µg/mL	(Awad 2004)
		Deoxyparguerol 7-acetate		483,441 [M] ⁺	Diterpène	70 et 80% d'inhibition de la viabilité des cellules tumorales du carcinome d'Ehrlich à 50 et 100 µg/mL, respectivement	

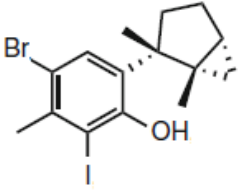
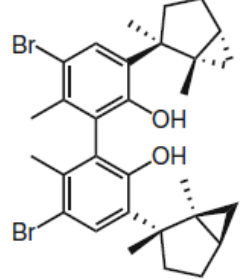
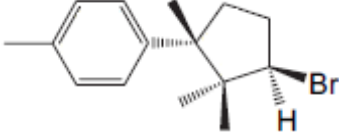
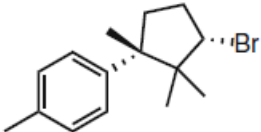
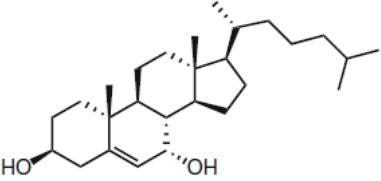
<i>L. saitoi</i>		Isoparguerol 7,16-diacetate		541,478 [M] ⁺	Diterpène	100% d'inhibition de la viabilité des cellules tumorales du carcinome d'Ehrlich à 50 et 100 µg/mL	
<i>L. microcladia</i>	Mer Egée du Nord	10-hydroxy-isolaurene		216,322 [M] ⁺	Sesquiterpène	NSCLC-N6 (CI ₅₀ de 83,7 µM) A549 (81 µM)	(Kladi <i>et al.</i> 2005)
		Laurokamurene A		294,0628 [M] ⁺	Sesquiterpène	NSCLC-N6 (CI ₅₀ de 73,4 µM) A549 (52,4 µM)	
		-		294,0611 [M] ⁺	Sesquiterpène	NSCLC-N6 (CI ₅₀ de 196,9 µM) A549 (242,8 µM)	
<i>L. tristicha</i>	Mer de Chine	Laurebiphenyl		430,629 [M] ⁺	Sesquiterpène	A549 (CI ₅₀ de 1,68 µg/mL) BGC-823 (1,22 µg/mL) Bel 7402 (1,91 µg/mL) HCT-8 (1,77 µg/mL)	(Sun <i>et al.</i> 2005)

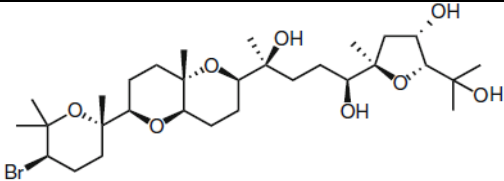
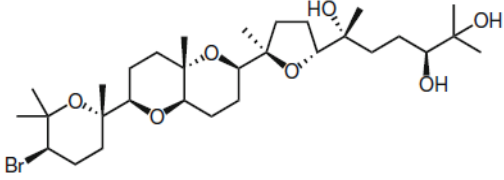
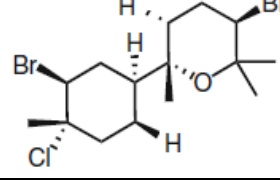
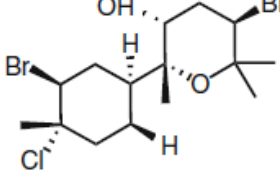
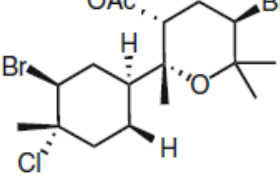
<i>L. brongniartii</i>	Sud de Taiwan	3,3'-bis-(2'-methylsulfinyl-2-methylthio-4,6,4',6'-tetrabromo) indole		655,7028 [M] ⁺	Indole	HT-29 P388	(El Gamal, Wang, and Duh 2005)
		3,3'-bis-(4,6-dibromo-2-methylsulfinyl) indole		671,6988 [M] ⁺	Indole	P388	
<i>L. obtusa</i>	Mer Egée Centrale	Debromoallolaurinterol (7-hydroxy-laurene)		216,322 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ de 64,2 μM) MCF-7 (15,8 μM) PC-3 (18,1 μM) HeLa (40,5 μM) A-431 (23,9 μM) CHO (78,2 μM)	(Kladi <i>et al.</i> 2006)
<i>L. obtusa</i>		Iso-laurenisol		295,218 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ de 127,4 μM) MCF-7 (95,5 μM) PC-3 (103,2 μM) HeLa (88,6 μM) A-431 (122 μM) CHO (165,5 μM)	
<i>L. microcladia</i>	Mer Egée du Nord	Bromolaurenisol		374,115 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ de 112,7 μM) MCF-7 (78,3 μM) PC-3 (92,4 μM) HeLa (105,8 μM)	

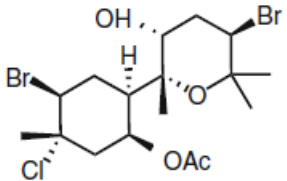
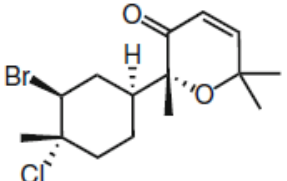
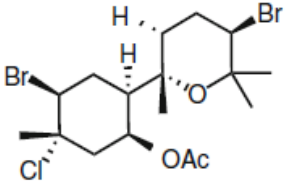
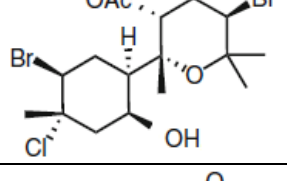
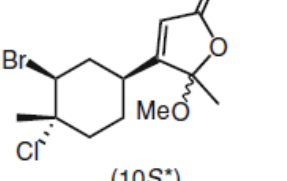
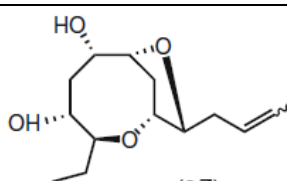
						A-431 (81,6 μM) CHO (>200 μM) NSCLC-N6 (26,5 μM)	
<i>L. obtusa</i>		3,7-dihydroxy-dihydrolaurene		234,338 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ >300 μM) MCF-7 (201,7 μM) PC-3 (182,3 μM) HeLa (121,3 μM) A-431 (176,4 μM) CHO (234,7 μM)	
<i>L. microcladia</i>		Laurinterol		295,218 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ de 128,3 μM) MCF-7 (67,2 μM) PC-3 (76,6 μM) HeLa (83,9 μM) A-431 (74,6 μM) CHO (165,8 μM)	
<i>L. obtusa</i>		Perforenone A		234,338 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ >300 μM) MCF-7 (>300 μM) PC-3 (138,3 μM) HeLa (117,7 μM) A-431 (105,1 μM) CHO (>300 μM)	

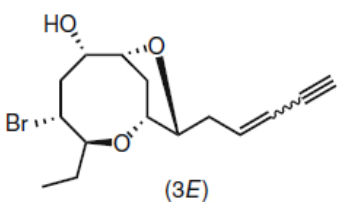
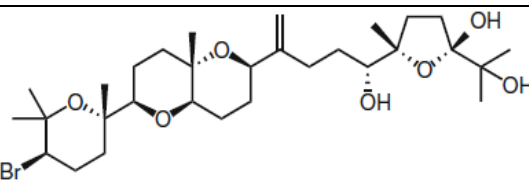
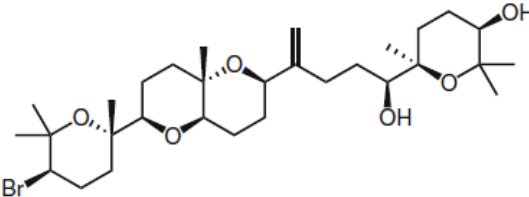
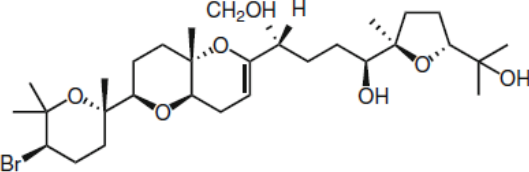
<i>L. obtusa</i>		3-epi-perforenone A		234,1614 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ >300 μM) MCF-7 (>300 μM) PC-3 (144,4 μM) HeLa (154,2 μM) A-431 (151,9 μM) CHO (>300 μM)	
<i>L. obtusa</i>		Perforenol B		299,25 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ de 67,4 μM) MCF-7 (28,2 μM) PC-3 (54,8 μM) HeLa (50,9 μM) A-431 (73,2 μM) CHO (80,2 μM)	
<i>L. obtusa</i>		-		297,0849 [M + H] ⁺	Sesquiterpène	A549 (Cl ₅₀ de 153,5 μM)	
<i>L. microcladia</i>		-		216 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (Cl ₅₀ >200 μM) MCF-7 (>200 μM) PC-3 (>200 μM) HeLa (>200 μM) A-431 (>200 μM) CHO (>200 μM) NSCLC-N6 (150,5 μM)	

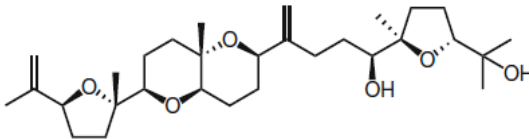
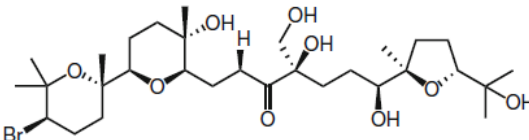
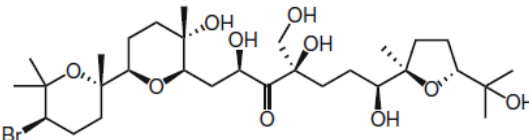
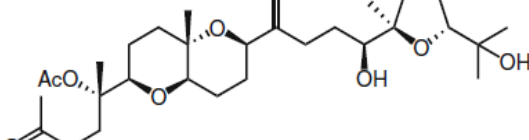
<i>L. microcladia</i>		(E)-2-tridecyl-2-heptadecanal		434,788 [M] ⁺	Aldéhyde α, β-insaturé	K-562 (CI ₅₀ de 82,7 μM) MCF-7 (51,4 μM) PC-3 (71,6 μM) HeLa (51,8 μM) A-431 (45,8 μM) CHO (107,6 μM)	
<i>L. microcladia</i>		-		586,1082 [M] ⁺	Sesquiterpène	K-562 (CI ₅₀ >300 μM) MCF-7 (>300 μM) PC-3 (126,2 μM) HeLa (111,3 μM) A-431 (137,1 μM) CHO (>300 μM)	
<i>L. microcladia</i>	Mer Egée du Nord	-		449.8835 [M - H] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 170,5 μM) MCF-7 (167,9 μM) PC3 (183,9 μM) HeLa (174,4 μM) A431 (178,8 μM)	(Kladi <i>et al.</i> 2007)
		Bromolaurinterol		374,115 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 98,7 μM) MCF-7 (104,1 μM) PC3 (75,2 μM) HeLa (114,6 μM) A431 (93,4 μM)	

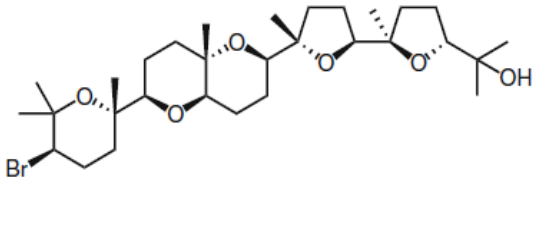
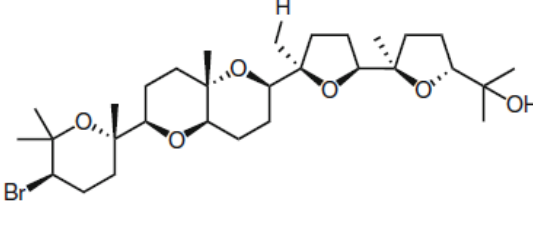
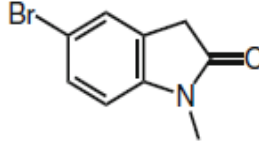
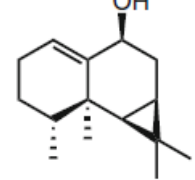
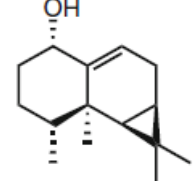
		8-iodolaurinterol		421,115 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 78,4 μM) MCF-7 (86,3 μM) PC3 (88,5 μM) HeLa (81,4 μM) A431 (92,7 μM)	
		-		586,1087 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ >300 μM) MCF-7 (>300 μM) PC3 (>300 μM) HeLa (>300 μM) A431 (>300 μM)	
		(-)-α-bromocuparene		281,235 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 287,3 μM) MCF-7 (265,4 μM) PC3 (271,3 μM) HeLa (240,8 μM) A431 (277,4 μM)	
		α-isobromocuparene		281,235 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 130,4 μM) MCF-7 (177,6 μM) PC3 (191,2 μM) HeLa (204,3 μM) A431 (198,4 μM)	
<i>L. tristicha</i>	Mer de Chine méridionale	Cholest-5-en-3β,7α- diol		402,659 [M] ⁺	Stéroïde	A549 (CI ₅₀ de 16,8 μM) BGC-823 (5,1 μM) Bel 7402 (0,5 μM)	(Sun <i>et al.</i> 2007)

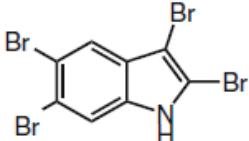
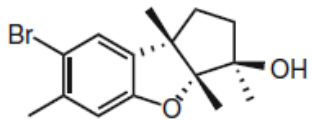
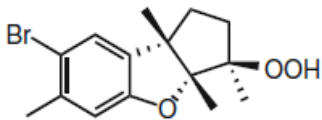
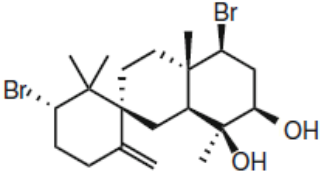
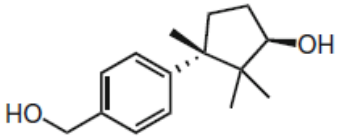
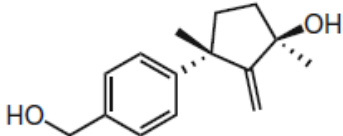
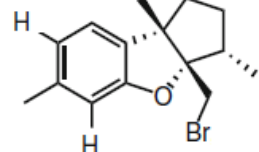
						HCT-8 (0,5 μ M)	
<i>L. mariannensis</i>		21 α -hydroxy-thyrsiferol		645,2791 [M + Na] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 6,6 μ g/mL)	(Ji <i>et al.</i> 2008)
		Laurenmariannol		607,3049 [M + H] ⁺	Triterpène	P388 (Cl ₅₀ de 0,6 μ g/mL)	
<i>L. catarinensis</i>	Brésil	Deoxycaespitol		416,623 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (Cl ₅₀ de 12,5 μ M) MCF-7 (11,2 μ M) A431 (13,1 μ M)	(Lhullier <i>et al.</i> 2010)
		Caespitol		432,622 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (Cl ₅₀ de 7,6 μ M) MCF-7 (9,7 μ M) A431 (10,2 μ M)	
		8-acetylcaespitol		474,659 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (Cl ₅₀ de 16,1 μ M) MCF-7 (17,6 μ M) A431 (17,4 μ M)	

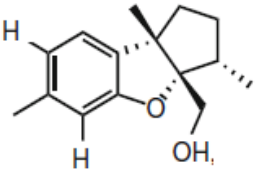
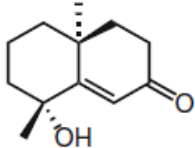
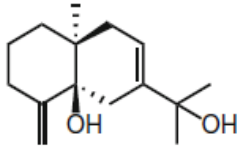
		(5S)-5-acetoxy-caespitol		510,9838 [M + Na] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 12,4 μM) MCF-7 (11,7 μM) A431 (13,1 μM)	
		Caespitenone		349,694 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 18,9 μM) MCF-7 (19,7 μM) A431 (21,6 μM)	
		(5S)-5-acetoxy-deoxycaespitol		470,9895 [M - H] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 48,8 μM) MCF-7 (52,4 μM) A431 (54,9 μM)	
		(5S)-5-hydroxy-acetylcaespitol		489,0017 [M + H] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 70,4 μM) MCF-7 (73,6 μM) A431 (72,1 μM)	
		(10S*)-10-O-methylfurocaespitanel actol		337,0195 [M + H] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (CI ₅₀ de 85,6 μM) MCF-7 (89,0 μM) A431 (91,7 μM)	
<i>Laurencia</i> sp.	Philippines	Laurefurenyne C		289,1415 [M + Na] ⁺	C15 acétogénine	L1210 (200 μg/disque) Côlon 38 (200 μg/disque) H-116 (200	(Abdel-Mageed <i>et al.</i> 2010)

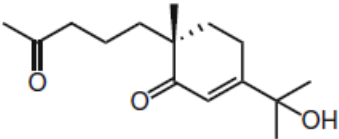
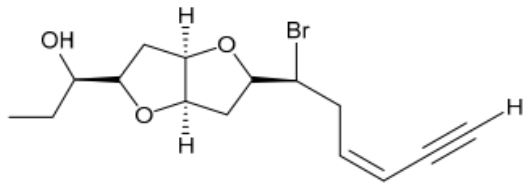
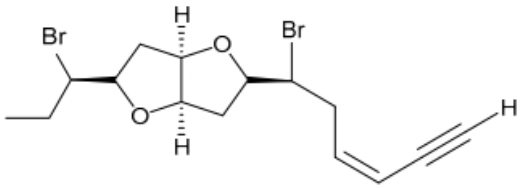
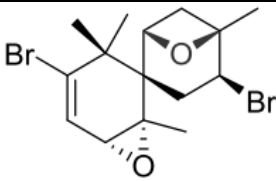
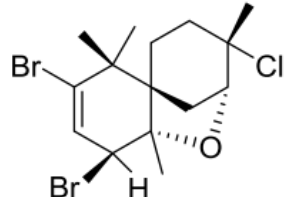
						<p>µg/disque) H-125 (100 µg/disque)</p>	
		Laurefurenyne F	 <p>(3E)</p>	351,0568 [M + Na] ⁺	C15 acétogénine	<p>L1210 (250 µg/disque) Côlon 38 (450 µg/disque) CFU-GM (400 µg/disque) H-116 (200 µg/disque) H-125 (100 µg/disque)</p>	
<i>L. viridis</i>	Îles Canaries	22-hydroxy-15(28)- dehydrovenustatriol		627,2723 [M + Na] ⁺	Triterpène	<p>Jurkat (CI₅₀ de 2 µM) HeLa (2,9 µM)</p>	(Cen- Pacheco <i>et al.</i> 2011a)
		lubol		611,3607 [M + Na] ⁺	Triterpène	<p>Jurkat (CI₅₀ de 3,5 µM) MM144 (13 µM) HeLa (27 µM) CADO-ES1 (11 µM)</p>	(Cen- Pacheco <i>et al.</i> 2011a)
		15- dehydroxythyrseol A		602,2810 [M] ⁺	Triterpène	<p>Jurkat (CI₅₀ de 7,55 µM) MM144 (7,3 µM) HeLa (23 µM)</p>	(Cen- Pacheco <i>et al.</i> 2011b)

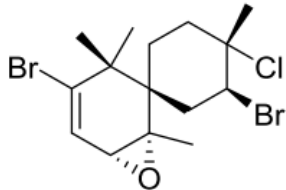
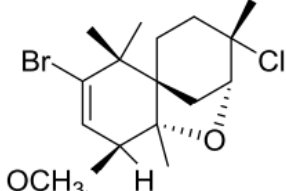
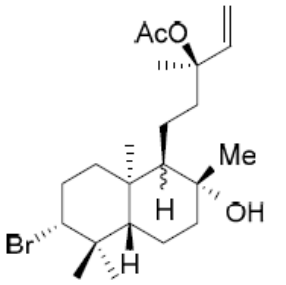
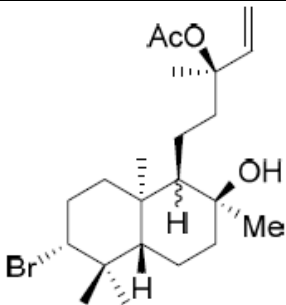
						CADO-ES1 (16,5 μM)	
		1,2-dehydropseudodehydro-thyrsiferol		524,737 [M] ⁺	Triterpène	Jurkat (Cl ₅₀ de 15,5 μM) MM144 (16,5 μM) HeLa (24 μM) CADO-ES1 (10,6 μM)	(Pacheco <i>et al.</i> 2011a)
		Prethyrsenol A		659,2217 [M + Na] ⁺	Triterpène	Jurkat (Cl ₅₀ de 8,15 μM) MM144 (10,2 μM) HeLa (29 μM) CADO-ES1 (14,5 μM)	(Cen-Pacheco <i>et al.</i> 2011b)
		13-hydroxy-prethyrsenol A		657,2614 [M - H ₂ O + Na] ⁺	Triterpène	Jurkat (Cl ₅₀ de 7,2 μM) MM144 (15,5 μM) HeLa (26 μM) CADO-ES1 (3,1 μM)	(Cen-Pacheco <i>et al.</i> 2011b)
		Secodehydrothyrsiferol		561,3407 [M + Na] ⁺	Triterpène	Jurkat (Cl ₅₀ de 2,5 μM) MM144 (12 μM) HeLa (30 μM) CADO-ES1 (12,2 μM)	(Cen-Pacheco <i>et al.</i> 2011a)

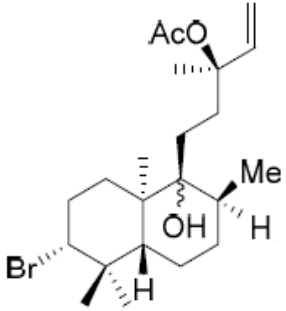
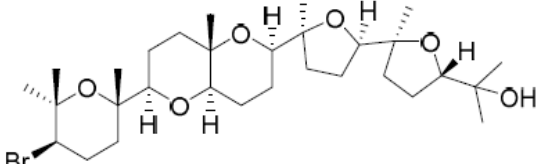
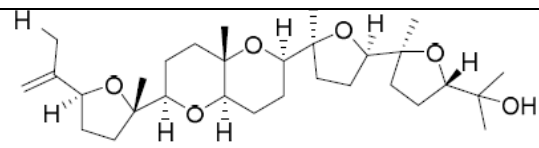
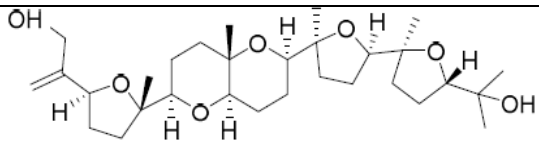
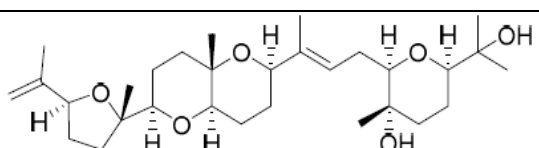
<i>L. viridis</i>	Îles Canaries	Saiyacenol A		611,2756 [M + Na] ⁺	Triterpène	Jurkat (CI ₅₀ de 7,8 μM) MM144 (27 μM) HeLa (27,5 μM) CADO-ES1 (25,5 μM)	(Cen-Pacheco <i>et al.</i> 2012)
		Saiyacenol B		611,2761 [M + Na] ⁺	Triterpène	Jurkat (CI ₅₀ de 2,7 μM) MM144 (11 μM) HeLa (24,5 μM) CADO-ES1 (14 μM)	
<i>L. similis</i>	Mer de Chine méridionale	N-methyl-5-bromo-1,3-dihydro-indole-2-one		226,070 [M] ⁺	Indole	HL-60 (CI ₅₀ de 35,06 μM) Jurkat (53,27 μM)	(Sun <i>et al.</i> 2013)
<i>L. similis</i>	Bornéo	Ent-1(10)-aristolen-9-beta-ol		220,354 [M] ⁺	Sesquiterpène	MCF-7 (LC ₅₀ de 25 μg/mL) P388 (25 μg/mL) ATL (5 μg/mL)	(Kamada and Vairappan 2013)
		9-aristolen-1-alpha-ol		220,354 [M] ⁺	Sesquiterpène	MCF-7 (LC ₅₀ de 25 μg/mL) P388 (25 μg/mL) ATL (5 μg/mL)	

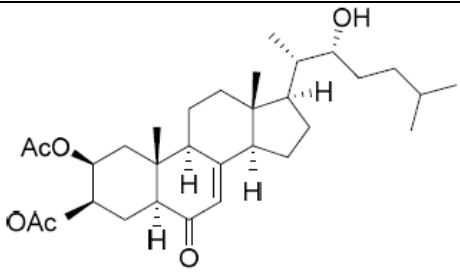
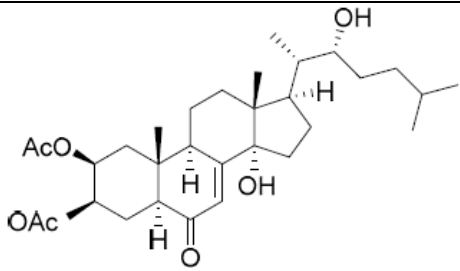
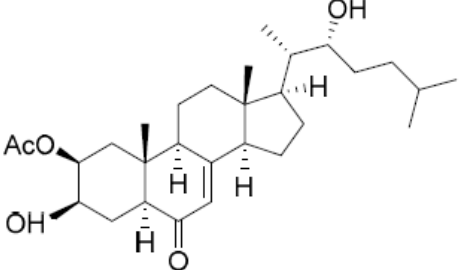
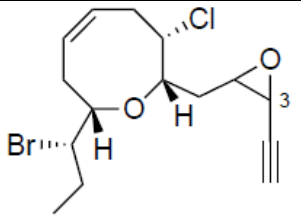
		2,3,5,6-tetrabromo-indole		432,735 [M] ⁺	Indole	MCF-7 (LC ₅₀ de 8 µg/mL) Hela (5 µg/mL) ATL (2,5 µg/mL)	
<i>L. okamurai</i>	Mer de Chine orientale	10-hydroxy-aplysin		311,218 [M] ⁺	Sesquiterpène	A-549 (CI ₅₀ de 15,4 µM)	(Yu <i>et al.</i> 2014)
		3β-hydroperoxyaplysin		327,218 [M] ⁺	Sesquiterpène	A-549 (CI ₅₀ de 35,3 µM)	
<i>L. obtusa</i>	Mer Rouge	10-hydroxy-kahukuene B		487,0654 [M + Na] ⁺	Diterpène	KB (CI ₅₀ de 0,1 µM) HepG2 (0,057 µM) MCF-7 (0,054 µM)	(Angawi <i>et al.</i> 2014)
		-		234,1620 [M] ⁺	Sesquiterpène	KB (CI ₅₀ de 0,213 µM) HepG2 (>0,5 µM) MCF-7 (>0,5 µM)	
		Laur-2-ene-3,12-diol		232,1453 [M] ⁺	Sesquiterpène	KB (CI ₅₀ de 0,171 µM) HepG2 (>0,5 µM) MCF-7 (0,184 µM)	
<i>L. pacifica</i>	Mexique	Isoaplysin		295,218 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (GI ₅₀ de 15 µM) U87 (40 µM) MCF-7 (20 µM)	(Zaleta-Pinet <i>et al.</i> 2014)

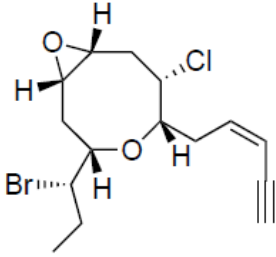
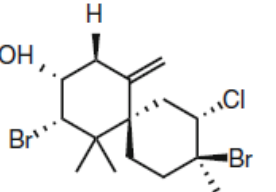
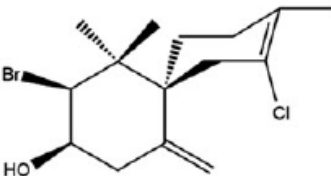
						A2780 (17 μM) H460 (34 μM) A431 (17 μM) Du145 (12 μM) BE2-C (27 μM) SJ-G2 (29 μM) MIA (23 μM) SMA (24 μM)	
		Debromoaplysinol		232,322 [M] ⁺	Sesquiterpène	HT29 (GI ₅₀ de 9,1 μM) U87 (26 μM) MCF-7 (14 μM) A2780 (10 μM) H460 (18 μM) A431 (9,6 μM) Du145 (6,8 μM) BE2-C (13 μM) SJ-G2 (15 μM) MIA (16 μM) SMA (14 μM)	
<i>L. obtusa</i>	Mer Rouge	Teuhetenone A		194,274 [M] ⁺	Sesquiterpène	MCF-7 (CI ₅₀ de 22,8 μM)	(Alarif <i>et al.</i> 2016)
		Eudesma-4(15),7-diene-5,11-diol		236,1772 [M] ⁺	Sesquiterpène	MCF-7 (CI ₅₀ de 39,5 μM)	

		Chabrolidione B		252,349 [M] ⁺	Sesquiterpène	MCF-7 (CI ₅₀ de 63,6 μM)	
<i>L. obtusa</i>	Golfe Salman	Isolaurenidificine		351,0559 [M + Na] ⁺	C15 acétogénine	A549 (CI ₅₀ de 15,6 μM) HepG-2 (15,1 μM) HCT116 (>20 μM) MCF-7 (15,5 μM) PC-3 (17,9 μM)	(Bawakid <i>et al.</i> 2017)
		Bromlaurenidificine		412,9728 [M + Na] ⁺	C15 acétogénine	A549 (CI ₅₀ de 15,9 μM) HepG-2 (15,3 μM) HCT116 (17,9 μM) MCF-7 (17,9 μM) PC-3 (>20 μM)	
<i>L. composita</i>	Chine	Compositacine D		389,9823 [M] ⁺	Sesquiterpène	A549 (CI ₅₀ de 85,2 μM)	(Yu <i>et al.</i> 2017)
		Compositacine G		409,9667 [M] ⁺	Sesquiterpène	A549 (CI ₅₀ de 48,6 μM)	

		Cycloelatanene A		385,0541 [M + Na] ⁺	Sesquiterpène	A549 (CI ₅₀ de 75,2 μM)	
		Cycloelatanene B		364,0633 [M] ⁺	Sesquiterpène	A549 (CI ₅₀ de 66,8 μM)	
<i>L. alfredensis</i>	Afrique du Sud	13-acetyl pinnatol A		451,1824 [M + Na] ⁺	Diterpène	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 26,3 μM) HeLa (30,2 μM)	(Dziwornu <i>et al.</i> 2017)
		Isoconcinndiol 13- acetate		451,1821 [M + Na] ⁺	Diterpène	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 53,7 μM) HeLa (9,3 μM)	

		Concinndiol 13-acetate		451,1821 [M + Na] ⁺	Diterpène	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 58,5 µM) HeLa (42 µM)
		Saiyacenol B		611,2761 [M + Na] ⁺	Triterpène	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 44,4 µM) HeLa (21,1 µM)
		Alfredensinol A		505,3527 [M - H] ⁺	Triterpène	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 13,5 µM) HeLa (46,4 µM)
		Alfredensinol B		545,3457 [M + Na] ⁺	Triterpène	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 13,5 µM) HeLa (46,4 µM)
		Alfredensinol C		507,3693 [M + H] ⁺	Triterpène	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 8,8 µM) HeLa (133,8 µM)

		Alfredensterol		517,3527 [M + H] ⁺	Stéroïde	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 27,6 μM) HeLa (25,6 μM)	
		14α-hydroxy alfredensterol		533,3488 [M + H] ⁺	Stéroïde	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 15,8 μM) HeLa (48,2 μM)	
		3-deacetoxy alfredensterol		475,3432 [M + H] ⁺	Stéroïde	MDA-MB-231 (CI ₅₀ de 21,6 μM) HeLa (43,5 μM)	
<i>L. viridis</i>	Îles Canaries	(3S,4R)-epoxy- pinnatifidenyne		371,0204 [M + Na] ⁺	C15 acétogénine	A549 (GI ₅₀ de 33 μM) HeLa (45 μM)	(Morales- Amador <i>et al.</i> 2017)

		(9R,10S)-epoxy-Z-pinnatifidenyne		371,0214 [M + Na] ⁺	C15 acétogénine	A549 (GI ₅₀ de 35 μM) HeLa (36 μM) SW1573 (13 μM) T-47D (48 μM)	
<i>L. dendroidea</i>	Côte sud-est brésilienne	Obtusol		414,606 [M] ⁺	Sesquiterpène	U937 (CI ₅₀ de 26,38 μM) Jurkat (30,05 μM) Colo-205 (3,06 μM) B16F10 (67,72 μM)	(Barcellos Marini <i>et al.</i> 2018)
		(-)-elatol		333,695 [M] ⁺	Sesquiterpène	U937 (CI ₅₀ de 37,34 μM) Jurkat (31,31 μM) Colo-205 (7,58 μM) B16F10 (54,65 μM)	

Annexe 3. Liste des pics m/z de la sous-fraction F25.18

m/z	Temps de rétention (min)	Adduit	[M] ⁺
136,0209	5,08		
136,0213	6,69	[M + NH ₄] ⁺	117,9874
171,1493	9,27	[M + NH ₄] ⁺	153,1155
219,1742	10,93	[M + NH ₄] ⁺	201,1403
219,1746	14,56		
219,1747	8,43	[M + Na] ⁺	196,1947
259,1912	21,12		
282,2219	21,69	[M + NH ₄] ⁺	264,1881
282,2221	21,4	[M + Na] ⁺	259,2421
282,2223	21,58		
308,2956	21,49		
310,3116	23,01		
312,3271	24,64		
313,2694	16,56		
313,2733	17,45		
313,2734	24,03		
313,2738	21,12		
313,2741	25,61	[M + Na] ⁺	290,2941
313,2747	16,54		
322,2524	25,86		
327,0036	7,09		
338,2861	23,91		
338,6857	24,42		
339,2899	17,47		
352,3213	22,41		
354,3356	24,02		
388,3944	20,64	[M + Na] ⁺	365,4144
393,3355	25,86	[M + H] ⁺	392,3285
394,3471	26,42		
394,3472	26,13		
394,5178	25,85		
394,6383	25,86		
394,7157	25,86	[M + Na] ⁺	371,7357
394,9411	25,85		
395,2086	25,85		
395,3503	25,87		
395,3504	26,03		

396,3537	25,9		
408,3088	22,02		
408,3239	25,86		
414,2606	13,39		
420,334	20,93		
425,2888	20,94		
450,4108	27,39	[M + H] ⁺	449,4038
451,3645	18,36		
473,346	18,33		
475,3282	16,58		
479,3937	20,72		
487,3633	18,22		
487,3636	18,39		
495,391	18,29		
496,4227	20,71		
497,4211	21,14		
501,3792	20,69		
506,4752	29,85		
507,4289	22,84		
512,4159	18,32		
515,3202	16,93		
517,3731	18,27		
521,3813	26,43		
524,4526	22,86		
529,4097	22,84		
540,4475	20,62		
545,4056	20,64		
561,2208	22,73		
561,2209	19,32		
561,221	18,33		
561,2214	23,6		
561,2216	19,13		
561,2217	24,75		
561,2227	18,87		
561,2231	19,94		
568,479	22,77		
573,4364	22,78		
577,1966	16,96		
589,4466	21,7		
591,4871	20,56		

593,4056	24,78
601,469	24,62
607,4194	25,19
613,4674	20,6
638,3153	21,28
697,4574	22,08
699,4686	21,11
743,4992	23,48
765,5168	24,61
767,5388	24,26
793,5491	25,8
795,5648	25,58
823,5233	23,55
887,5875	24,96

Annexe 4. Méthodologie d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

1. Identification des acides gras

L'identification d'un acide gras est basée sur l'examen des spectres de masse des EMAG (esters méthyliques d'acide gras) et des NAP (N-acyl pyrrolidides) ainsi que sur la position du pic chromatographique dans le chromatogramme. Les pics de base, m/z 74 pour les EMAG et m/z 113 pour les NAP, sont issus d'un réarrangement de Mac Lafferty.

- Identification des EMAG

Après séparation des composés par CPG/SM, un spectre de masse est associé à chaque pic chromatographique. Pour chaque pic, l'ion moléculaire a été repéré et a permis de déterminer la longueur des chaînes d'acide gras ainsi que le nombre d'insaturations en comparant son m/z aux valeurs indiquées dans le tableau de clés de détermination (Figure 1).

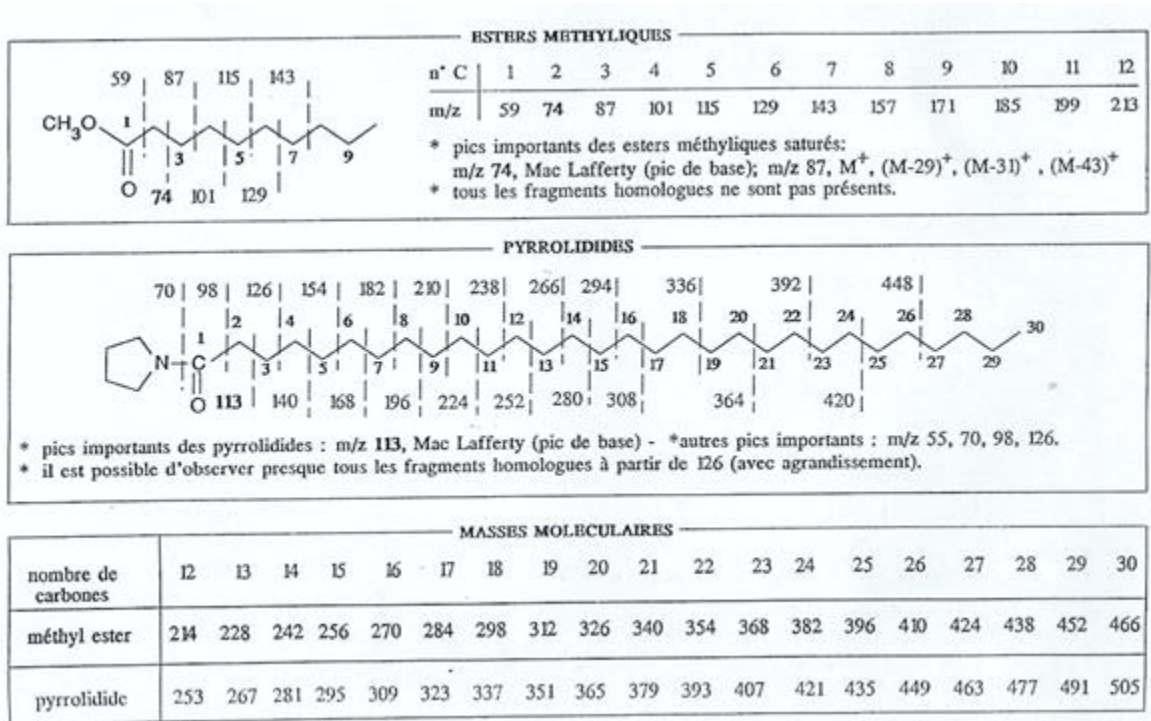


Figure 1. Clés d'interprétation des spectres de masse des dérivés d'acides gras : esters méthyliques et pyrrolidides (Barnathan 1993)

- Identification des NAP

Contrairement aux EMAG, les masses moléculaires des NAP sont impaires. L'ion moléculaire $[M]^+$ est fragmenté principalement à partir de l'extrémité fonctionnelle. La fragmentation se produit régulièrement entre chaque groupe méthylène, laissant ainsi un intervalle de 14 uma entre deux pics du spectre de masse (Figure 1). Une diminution de cet intervalle à 12 uma indique la présence d'insaturation. Les doubles liaisons présentes dans la structure sont donc localisées.

Ci-dessous quelques exemples de spectres de masses de dérivés d'acides gras (Figure 2 à 5).

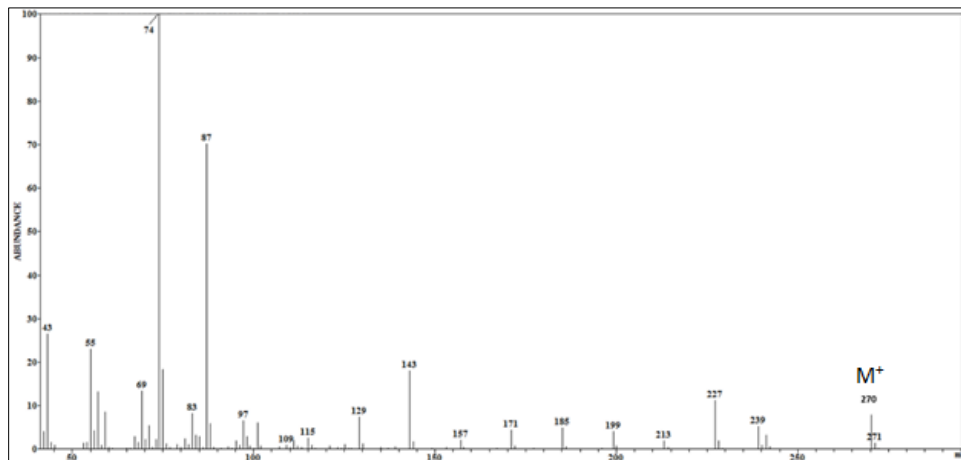


Figure 2. Spectre de masse du dérivé d'ester méthylique de l'acide palmitique C16:0 (pic moléculaire m/z 270)

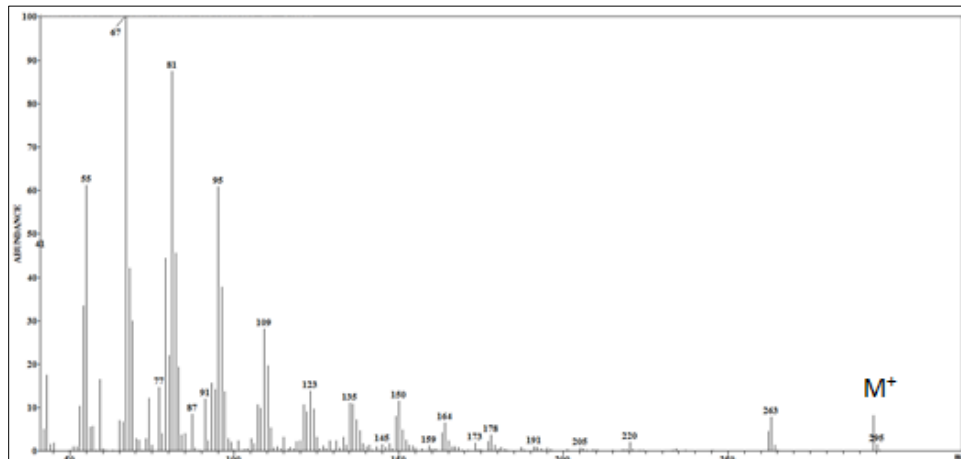


Figure 3. Spectre de masse du dérivé d'ester méthylique de l'acide linoléique C18:2 n-6 (pic moléculaire m/z 394)

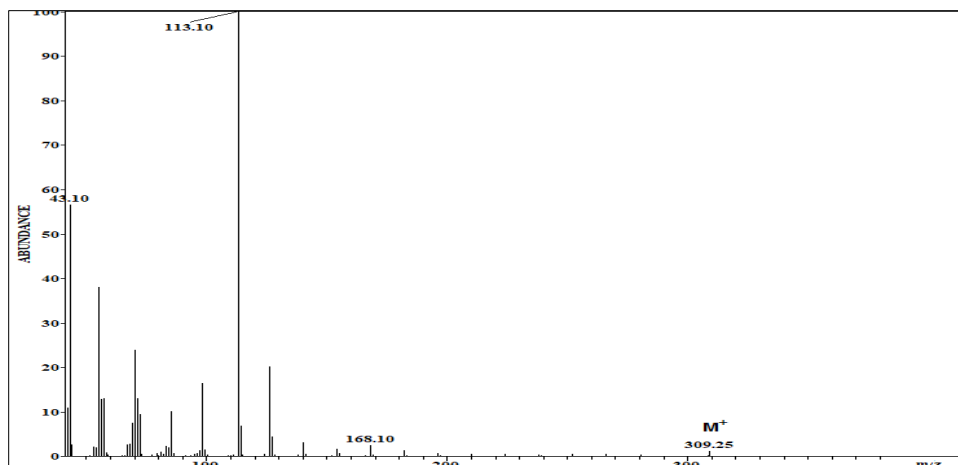


Figure 4. Spectre de masse du dérivé de pyrrolidine de l'acide palmitique C16:0 (pic moléculaire m/z 309)

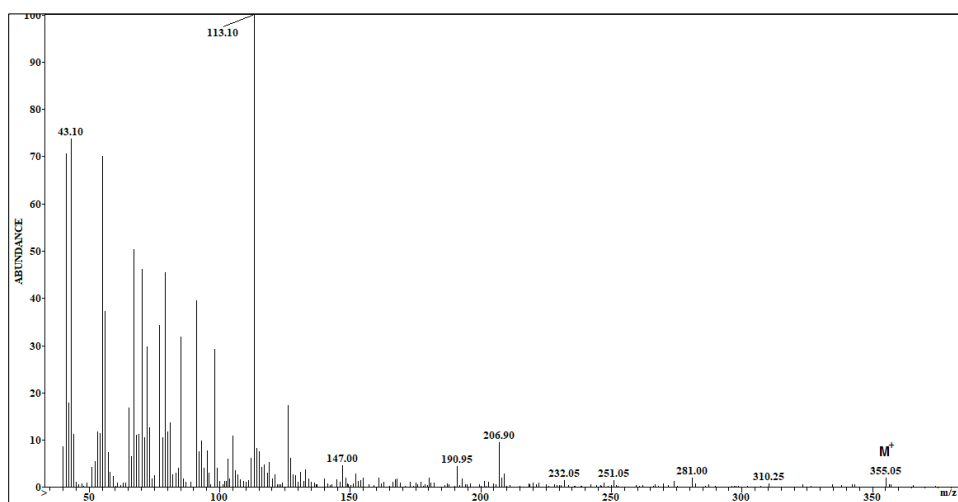


Figure 5. Spectre de masse du dérivé de pyrrolidine de l'acide eicosapentaénoïque C20:5 n-3 (pic moléculaire m/z 355)

2. Identification des stérols

- Détermination du nombre de carbones et d'insaturations

L'ion moléculaire ou un ion quasi moléculaire peut être visible sur le spectre de masse des stérols libres et de leurs dérivés. Les tableaux de la Figure 6 permettent de déterminer les nombres de carbone ainsi que le nombre d'insaturation à partir des spectres de masse des stérols libres et de leurs dérivés acétylés. Ces tableaux montrent l'influence d'une double liaison en 5 ou en 7 sur la présence ou l'absence du pic moléculaire des acétates de stérols. Ce pic est presque toujours présent pour les stérols libres, mais n'apparaît sur les acétates que pour les stérols ne présentant pas d'insaturations Δ^5 . Ceux

contenant cette insaturation, souvent les plus fréquents, présentent un spectre de masse sur lequel le pic $[M - \text{AcOH}]^+$, soit $[M - 60]^+$, est observé (Velosaotsy 2005).

Acétates de stérols

Ion $[M - \text{AcOH}]^+$ (Δ^5)

nb C* nb d.l.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	286	300	314	328	342	356	370	384	398	412	426
1	284	298	312	326	340	354	368	382	396	410	424
2	282	296	310	324	338	352	366	380	394	408	422
3	280	294	308	322	336	350	364	378	392	406	420
4	278	292	306	320	334	348	362	376	390	404	418

*nombre de carbones du stérol

Acétates de stérols

Ions M^+ de l'acétate (Δ^0, Δ^7)

nb C* nb d.l.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	346	360	374	388	402	416	430	444	458	472	486
1	344	358	372	386	400	414	428	442	456	470	484
2	342	356	370	384	398	412	426	440	454	468	482
3	340	354	368	382	396	410	424	438	452	466	480
4	338	352	366	380	394	408	422	436	450	464	478

*nombre de carbones du stérol

Tableau des masses moléculaires

3β -Hydroxystérol (ROH)

nb C nb d.l.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	304	318	332	346	360	374	388	402	416	430	444
1	302	316	330	344	358	372	386	400	414	428	442
2	300	314	328	342	356	370	384	398	412	426	440
3	298	312	326	340	354	368	382	396	410	424	438
4	296	310	324	338	352	366	380	394	408	422	436

nb C: nombre de carbones

nb d.l.: nombre de doubles liaisons

Figure 6. Détermination du nombre de carbones et d'insaturations à partir des pics moléculaires : $[M - \text{AcOH}]^+$ des acétates de stérols Δ^5 (tableau en haut), $[M]^+$ des acétates de stérols autres que Δ^5 (tableau au milieu) et $[M]^+$ des stérols libres (tableau en bas)

- Détermination de la position des insaturations

Connaissant le nombre d'insaturations, il est alors nécessaire de les localiser afin d'identifier correctement le stérol. Pour cela, certains pics caractéristiques du spectre de masse sont des sources d'information et serviront de points de repère lors de l'interprétation des spectres de masse :

- m/z 215 (pic de base) correspond à un stanol avec un cycle tétracyclique saturé mais peut avoir des insaturations sur sa chaîne latérale,

- m/z 213 correspond à un stérol $\Delta^5, \Delta^7, \Delta^8, \Delta^9, \dots$ ayant une double liaison au noyau tétracyclique,
- m/z 211 correspond à un stérol ayant deux doubles liaisons au niveau des cycles du noyau ($\Delta^{5,7}, \Delta^{5,8}, \dots$),
- m/z 209 correspond à un stérol contenant trois doubles liaisons ($\Delta^{5,7,9(11)}, \dots$).

La Figure 7 représente le chromatogramme du courant ionique total de la fraction insaponifiable des lipides neutres de *Laurencia papillosa* de la côte libanaise. Les chiffres indiquent les neuf stérols et les deux autres composés identifiés comme 1 : squalène, 2 : 22-déhydrocholéstérol, 3 : choléstérol, 4 : α -tocophérol, 5 : desmostérol, 6 : 24-méthylène choléstérol, 7 : campestérol, 8 : cholést-4-èn-3-one, 9 : cholést-4,6-dien-3-one, 10 : sitostérol, 11 : fucostérol.

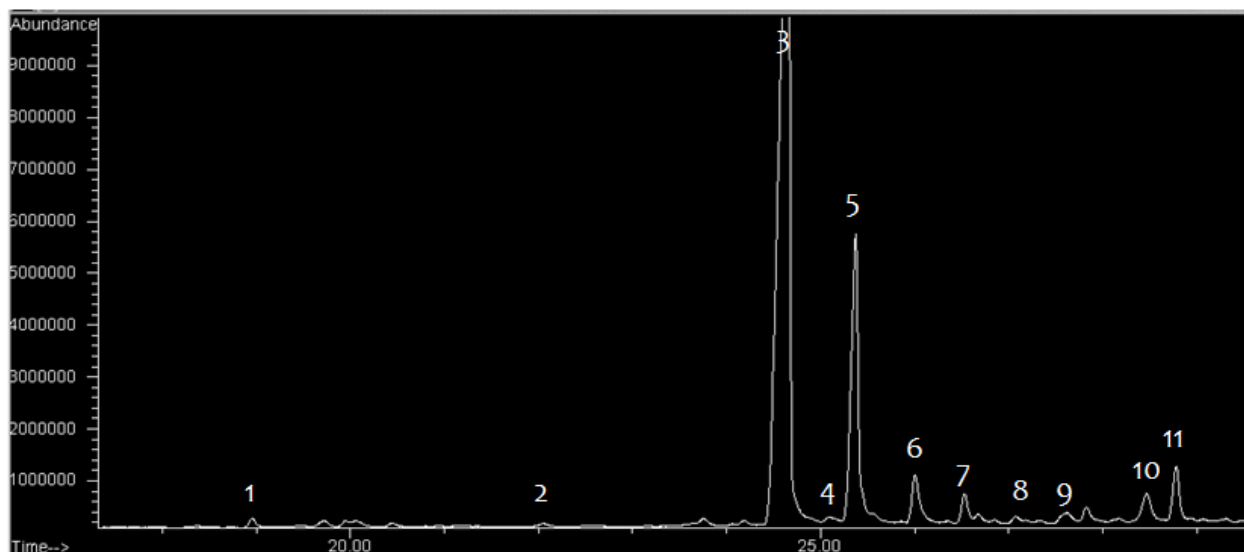


Figure 7. Chromatogramme du courant ionique total (TIC) de la fraction de lipides neutres de *Laurencia papillosa*

Titre : Fractionnement bioguidé de *Laurencia papillosa* de la côte libanaise : identification du cholest-4-èn-3-one, un nouvel agoniste de LXR cytotoxique pour les cellules du cancer du sein

Mots clés : *Laurencia papillosa*, métabolisme des lipides, cancer du sein, cholest-4-èn-3-one, liver X receptor (LXR), radeaux lipidiques

Résumé : Les algues marines présentent un grand intérêt en tant que source prometteuse de composés biochimiquement actifs. Dans ce contexte, l'algue rouge *Laurencia papillosa* de la côte libanaise a fait l'objet d'un fractionnement bioguidé pour isoler des composés cytotoxiques. En parallèle, une analyse de la composition lipidique de cette algue a été réalisée.

L'analyse lipidique a montré que la teneur totale en lipides était faible et que la fraction principale était les glycolipides, suivis des lipides neutres et des phospholipides. Les acides gras saturés constituaient la principale classe d'acides gras, suivis des acides gras polyinsaturés en C20. En outre, divers stérols ont été identifiés et le cholestérol s'est révélé le plus dominant. Le fractionnement bioguidé de l'extrait algal a conduit à l'identification du cholest-4-èn-3-one.

L'étude de ce stéroïde sur nos modèles de cellules cancéreuses du sein a montré qu'il réduit l'expression des enzymes de la lipogenèse et de la synthèse du cholestérol. De plus, ce métabolite augmente l'expression des transporteurs ABC impliqués dans l'efflux de cholestérol, ainsi que l'expression de LXR dans un modèle macrophagique. La réduction de l'expression de la flotilline-2 et de l'EGFR dans les radeaux lipidiques témoigne de son action sur les voies de signalisation actives dans le cancer. En conséquence, une inhibition de la croissance et de la migration cellulaire a été notée. Ces résultats indiquent que le cholest-4-èn-3-one exerce une activité agoniste de LXR dans les cellules cancéreuses du sein : il diminue la croissance cellulaire, augmente l'expression des transporteurs ABC et, ce qui est intéressant, réduit la lipogenèse.

Title: Bioguided fractionation of *Laurencia papillosa* from the Lebanese coast: identification of cholest-4-en-3-one, a new cytotoxic LXR agonist for breast cancer cells

Keywords: *Laurencia papillosa*, lipid metabolism, breast cancer, cholest-4-en-3-one, liver X receptor (LXR), lipid rafts

Abstract: Marine algae are of great interest as a promising source of biochemically active compounds. In this context, the red alga *Laurencia papillosa* from the Lebanese coast was subjected to a bioguided fractionation to isolate cytotoxic compounds. In parallel, an analysis of the lipid composition of this alga was performed.

Lipid analysis showed that the total lipid content was low and that the main fraction was glycolipids, followed by neutral lipids and phospholipids. Saturated fatty acids were the main class of fatty acids, followed by C20 polyunsaturated fatty acids. Besides, various sterols have been identified and cholesterol has been found to be the most dominant.

The bioguided fractionation of the algal extract led to the identification of cholest-4-en-3-one.

The study of this steroid on our models of breast cancer cells has shown that it reduces the expression of the enzymes of lipogenesis and cholesterol synthesis. In addition, this metabolite increases the expression of the ABC transporters involved in cholesterol efflux, as well as the expression of LXR in a macrophage model. Moreover, the steroid disrupts the integrity of lipid rafts and active signaling pathways in cancer, evidenced by reduced expression of flotillin-2 and EGFR in lipid rafts. As a result, inhibition of cell growth and migration was noted. These results indicate that cholest-4-en-3-one exerts LXR agonist activity in breast cancer cells: it decreases cell growth, increases expression of ABC transporters and, interestingly, reduces lipogenesis.