



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بو عريريج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie

Intitulé

**Etude du potentiel hépatoprotecteur de l'extrait brut de
polysaccharides issus de l'algue brune
*Laminaria sp.***

Présenté par :

Benkaddour Nesrine

Semara Yousra

Soutenu le : 14/09/2021

Devant le jury :

Président :	Mme Boulkroune Hasna	MCB. U BBA
Encadrant :	Mr Mezdour Hichem	MCB. U BBA
Examinatrice :	Mme Benradia Hamida	MCB. U BBA

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

*Pour commencer, parce qu'il existe toujours un début à tout, nous remercions notre **Dieu**, le tout puissant, qui nous a donné la force, la patience, ainsi que le courage pour dépasser toutes les difficultés.*

*Nous tenons à remercier sincèrement notre encadrant **Dr. Mezdour Hichem** pour avoir accepté de diriger ce travail, ainsi que pour sa simplicité, son attention, sa prudence et sa générosité scientifique, sa disponibilité, sa confiance et pour ses remarques et ses conseils.*

*Nous remercions, **Dr. Boulkroune Hasna** d'avoir bien voulu accepter de présider le présent jury de soutenance.*

*Nous n'oublierons pas de remercier **Dr. Ben radia Hamida**, examinatrice, qui a bien voulu juger et apprécier ce travail.*

Nous exprimons nos plus sincères remerciements à tous les membres du Laboratoire de notre département sans exception.

*Nos remerciements s'adressent également au laboratoire de recherche biologie et environnement LBE de l'Université des frères Mentouri de Constantine et en particulier à sa directrice **Pr Amedah Souad** et le chef d'équipe **Pr Menad Ahmed**, de nous avoir procuré le matériel et réactifs nécessaires pour nos manipulations.*

*Nous adressons nos profonds remerciements à **Nos parents et nos frères et sœurs** pour leur soutien moral et intellectuel et leurs encouragements tout au long de nos parcours de formation.*

Sans oublier tous nos enseignants du département des Sciences de la Nature et de la Vie.

*Enfin, nous remercions **toute personne** qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail et pour leurs soutien et encouragements qui étaient d'une grande aide.*

Dédicaces

Je dédie ce travail à

*Mes parents, **Mohammed Ridha** et **Fatiha** qui m'ont soutenu et encouragé durant mes années d'études et qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite.*

A mes frères et mes sœurs pour leur affection, compréhension et patience tous simplement je voudrais leur dire je l'aime de tout mon cœur.

A ma grande famille, du grand au petit

*A ma **Chère binôme Yousra** et sa famille avec qui j'ai partagé les bons et les durs moments.*

*A tous mes amis, surtout **Ouled Ali Dihya, Fezzaa Ghada Rayene, Charif Asma, hammouche wided**, qui me donnent de l'amour et de la vivacité*

A tous mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université

A tous ceux que j'aime

Nesrine

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail en signe de respect

*À mes parents **Ahmed** et **Nadjet** aucun mot ne serait exprimé mon amour, mon affection et ma grande considération pour vous, pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, instruction et ma réussite.*

*À mes très chers frères : **Abd Raouf**, **Abd Rahim**, **Abd Rahman**, **Mohamed el Amine**.*

A ma grande famille, du grand au petit

*À ma très chère binôme **Nesrine**, avec j'ai partagé les meilleurs moments malgré toutes les difficultés et les souffrances qu'on a passées, ainsi que toute sa chère famille.*

*À toutes mes amies surtout **Rezigat Yousra**, **Rouabah Maroua**, **Ouled Ali Dihya**, **Fezzaa Ghada Rayene**, **Charif Asma**, **hammouche wided** sans oublier **Malik** et **Fayçal** qui m'ont toujours encouragé durant la période de mémoire.*

*À tous mes professeurs de l'université qui m'ont aidé à développer et d'enrichir mes connaissances scientifiques, surtout le **Dr Aliat Toufik**, qui m'a soutenu à poursuivre ma carrière universitaire.*

*Ainsi à tous mes collègues de **MITOXICOLOGIE** et tous ceux ou celles qui m'ont apporté leur soutien, réconfort moral et à leur contribution dans l'élaboration de ce mémoire.*

Yousra

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces.....	
Table des matières	
Liste des figures.....	
Listes des tableaux.....	
Liste des Abréviations	
Résumé	
Introduction	1
I. MATERIEL ET METHODES	3
1. MATERIEL.....	3
1.1. Matériel végétal	3
1.2. Matériel animal.....	5
1.3. Réactifs	6
1.4. Appareillage.....	7
2.METHODES	7
2.1. Méthodes d'évaluation in vitro de l'activité de l'extrait de polysaccharides	7
2.2. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques du sang.....	11
2.3. Méthodes de dosage des paramètres du stress oxydant.....	12
3.EVALUATION STATISTIQUE	15
II. RESULTATS.....	16
1. Evaluation de l'activité d'extrait de polysaccharides in vitro	16
1.1. Évaluation de l'activité protectrice de l'extrait de polysaccharides	16
1.2. Evaluation de la non-toxicité de l'extrait de polysaccharides pour les globules rouges	16
1.3. Evaluation de l'activité stabilisatrice des membranes des GR par l'extrait de polysaccharides contre un stress osmotique	17
2. Evaluation de l'activité d'extrait de polysaccharides in vivo.....	18
2.1. Effet de l'extrait de polysaccharides algaux sur les paramètres biochimiques du sang	18
2.2. Evaluation de l'effet de l'extrait de polysaccharides algaux sur les paramètres du stress oxydant	19
III. DISCUSSION.....	21
Conclusion et perspectives	28
Références bibliographiques.....	29

Liste des figures

Figure 1: <i>Laminaria sp.</i> (Baie de Concarneau, France sur l'estran, 2008)-----	3
Figure 2: L'homogénat de foie -----	6
Figure 3 : Test d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) par la chaleur (72°C) ----	8
Figure 4: Récupération de la suspension érythrocytaire -----	8
Figure 5 : Le surnageant récupérer pour l'évaluation de l'activité anti hémolytique-----	10
Figure 6: Teste de l'activité stabilisatrice avec différent concentration de l'extrait et de NaCl -----	11
Figure 7 : Les réactions d'évaluation quantitative des transaminases-----	11
Figure 8 : Les fractions obtenues pour le dosage de MDA-----	12
Figure 9 : Formule chimique du Glutathion réduit. (Lahouel, 2005).-----	13
Figure 10 : Réaction d'Ellman (Ellman, 1959).-----	13
Figure 11: Dosage de GSH-----	14
Figure 12 : Dosage de CAT utilisant H ₂ O ₂ -----	15
Figure 13 : Taux de protection contre la dénaturation thermique du BSA en présence de l'aspirine et de l'extrait de polysaccharides algaux -----	16
Figure 14: Pourcentage de protection des GR en fonction des concentrations de l'extrait de polysaccharides algaux contre un stress osmotique. -----	17
Figure 15: Effet de l'extrait de polysaccharides algaux sur le taux du MDA hépatique -----	19
Figure 16: Influence de l'administration de l'extrait de polysaccharides algaux sur la concentration hépatique en GSH-----	20
Figure 17: L'effet de l'extrait de polysaccharide algaux sur l'activité de la CAT -----	21

Listes des tableaux

Tableau I : Pourcentage d'hémolyse avec différentes concentrations de l'extrait algal. ----- 17

Tableau II:résultats de dosage de ALT AST----- 18

Liste des Abréviations

ALT : Alanine aminotransférases

APAP : N-acétyle aminophénol

AST : Aspartate aminotransférases

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CAT : Catalase

DTNB : Acide Thionitrobenzoïque

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

GR : Globule rouge

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

KCL : Chlorure de potassium

KH₂PO₄ : Potassium dihydrogène phosphate

K₂HPO₄ : Dipotassium hydrogène phosphate

LBE : Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

MDA : Molonyldialdéhyde

NaCl : Chlorure de sodium

NAPQI : N-acétyle-p-benzoquinone imine

OH* : Radical hydroxyle

PBS : Le tampon phosphate salin

ROS : Espèce réactive de l'oxygène

TBA : Acide Thiobarbiturique

TCA : Trichloroacide Acétique

TEP : 1,1,3,3-Tetraétoxypropane

TNB : Acide thionitrobenzo

Résumé

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur des polysaccharides extraits d'algue *laminaria sp* sur la toxicité hépatique induite par le paracétamol.

Ces polysaccharides sont des macromolécules capables de protéger certains organes principalement le foie contre la peroxydation lipidique et les lésions induites par des substances toxiques.

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait d'algue *laminaria sp* induit une diminution des biomarqueurs hépatique du stress oxydatif à savoir la CAT, GSH, MDA, de même les activités enzymatiques l'ALT, AST chez les rats *Wistar* traitée par le paracétamol. Aussi que le traitement à cet extrait montre qu'il a une activité anti hémolytique chez l'homme.

Mots-clés : *laminaria sp*, polysaccharides, extrait d'algue, foie.

Summary

The main objective of this study is the evaluation of the hepatoprotective effect of polysaccharides extracted from alga *laminaria sp* on paracetamol-induced liver toxicity.

These polysaccharides are macromolecules capable of protecting certain organs mainly the liver against lipid peroxidation and damage induced by toxic substances.

The results obtained reveal that the algae extract of *laminaria sp* induces a decrease in hepatic biomarkers of oxidative stress namely CAT, GSH, MDA, as well as the enzymatic activities ALT, AST in *Wistar* rats treated with paracetamol. Also, that treatment with this extract shows that it has anti hemolytic activity in humans.

Keywords : *laminaria sp*, algae extract, polysaccharides, liver.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم التأثير الوقائي للكبد للمتعدد السكريات المستخرج من الطحالب لاميناريا على السمية الكبدية التي يسببها الباراسيتامول. هذه العدييات السكرار يد هي جزيئات كبيرة قادرة على حماية أعضاء معينة، وخاصة الكبد، من بيروكسيد الدهون والآفات التي تسببها المواد السامة.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلص الطحالب لاميناريا يؤدي إلى انخفاض في المؤشرات الحيوية الكبدية للإجهاد التأكسدي CAT, GSH, MDA, كذلك الأنشطة الانزيمية ALT, AST, في الفئران *Wistar* التي تمت معالجتهم بالباراسيتامول. بالإضافة الى ذلك تم الوصول الى نتائج تؤكد ان مستخلص الطحالب لاميناريا ديجيتاتا له نشاط ضد انحلال الدم لدى الانسان.

الكلمات المفتاحية: لاميناريا، مستخلص الطحالب، إنزيمات، كبد.



INTRODUCTION



Introduction

Le foie est le plus grand organe intracorporel du corps humain et joue un rôle prédominant dans plusieurs fonctions pivots pour maintenir des activités physiologiques normales (**Wisniewski et al., 2016**) telles que le contrôle de la glycémie, la synthèse de diverses hormones et la désintoxication des substances endogènes et exogènes (**Casotti et Antiga 2019 in Jiu et al., 2019**).

L'hépatotoxicité est l'un des cas cliniques les plus répons en pathologie hépatique (**Chen et al., 2018 ; Wang et al., 2017**). L'acétaminophène (APAP) est un médicament analgésique et antipyrétique largement utilisé, qui est sûr à des doses thérapeutiques. Cependant, l'hépatotoxicité sévère résultant de doses excessives est la principale cause d'insuffisance hépatique aiguë dans le monde occidental (**Gong et al., 2018**). À des doses thérapeutiques, l'APAP est principalement métabolisé en métabolites solubles dans l'eau non toxiques par glucuronidation et sulfatation dans le foie, et seule une petite fraction de l'APAP est métabolisée par divers cytochromes P450 (CYPs) en un produit actif toxique, la N-acétyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) (**McGill et al., 2012 ; Reid et al., 2005**). NAPQI excessive déclenche le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial, la nécrose cellulaire, l'apoptose, et même les dommages hépatiques (**Huo et al., 2017**).

Depuis la dernière décennie, l'écosystème marin est considéré comme incomparable réservoir de produits naturels bioactifs, dont beaucoup présentaient des caractéristiques structurelles qui n'ont pas été trouvées chez les plantes terrestres (**Samee H et al., 2009**). En milieu marin, les algues sont de deux types, les microalgues et les macroalgues (**Rasmussen et Morrissey., 2007**). Les archives ont montré que les macroalgues comme *Laminaria sp* ont été consommé dans l'alimentation humaine notamment comme légume en Asie, depuis 600 av. J.-C. (**Tabarsa M et al., 2012**) et les Chinois les utilisaient à des fins médicinales dès 300 av. J.-C. (**Abdel-Rahman MK et EL-Megeid AAA., 2006**). *Laminaria sp* est utilisé en tant qu'un agent antioxydant, anti viral, et essentiellement hépatoprotecteur grâce à la présence des polysaccharides.

C'est dans ce contexte, l'objectif de ce travail porte sur l'étude de potentiel hépatoprotecteur des polysaccharides issus de l'algue brune *Laminaria sp*, notre approche est divisée en deux parties :

⇒ Première partie : Comporte une étude *in vitro* sur la capacité de notre extrait à stabiliser le BSA, la membrane des GR ainsi que sa non-toxicité vis-à-vis de ces dernières, cette série de tests nous servira comme indicateur préliminaire sur l'efficacité de notre extrait à prévenir les hépatites.

⇒ Deuxième partie : Comporte une série de tests et de dosage dans le but d'évaluer le potentiel hépato-protecteur de notre extrait sur des échantillons de foie issus des différents groupes de rats ayant reçu différents traitement (paracétamol, extrait...) *in vivo*.

L'étude s'achève par une discussion générale ou on a traité et discuté l'ensemble des résultats obtenus, suivie d'une conclusion et perspectives.



MATERIEL ET METHODES



I. MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL

▪ Avant de commencer, nous tenons à préciser que les échantillons qui ont servi à la réalisation de ce travail, à savoir l'extrait de polysaccharides, les fragments de foie des rats ainsi que certaines données liées à l'expérimentation, nous ont été grassement fournis par le laboratoire LBE de l'université des frères Mentouri à Constantine.

1.1. Matériel végétal

Cette étude a porté sur *Laminaria sp*, une espèce d'algues brunes de la famille des *Laminariaceae*.



Figure 1: *Laminaria sp.* (Baie de Concarneau, France sur l'estran, 2008)

1.1.1. Description et distribution

Laminaria sp est une macro-algue de couleur brune à vert olive qui mesure 1 à 4 mètres de long, lisse au toucher et sa consistance ressemble à du caoutchouc. Se développe dans les zones plus ou moins exposées ou sur des sites avec de forts courants en Atlantique, Manche, Mer du Nord et Mer Baltique, certaines espèces se trouvent aussi en méditerranée avec une abondance plus ou moins importante (MEER, et SPA/RAC-ONU, 2018). Elle vit fixée de 3 à 5 ans sur les rochers de la zone basse des marées et suivant la clarté des eaux, jusqu'à une profondeur maximale de 20 m. Elle cesse de croître de la fin de l'été jusqu'à la fin de l'hiver. (Perez, 1971)

1.1.2. Classification

Domaine : Eukaryota

Règne : Chromista

Embranchement : Ochrophyta

Classe : Phaeophyceae

Ordre : Laminariales

Famille : Laminariaceae

Genre : *Laminaria*

Espèce : *Laminaria sp*

1.1.3. Utilisation

Laminaria sp est largement utilisé dans l'alimentation humaine et animale, les engrais et dans l'industrie (Savonneries, cosmétiques, pharmaceutiques...) grâce à sa richesse en polysaccharides, acides aminés, minéraux, iode... (Isabelle, 2004)

1.1.4. Récolte de *Laminaria sp*

Les échantillons de *Laminaria sp* ont été récoltés en laisse de mer (région de Jijel) à la fin du mois d'Avril 2015. Ils sont ensuite lavés puis séchés à l'air libre et à l'ombre. Les algues collectées devenues sèches, ont été conservées dans de la glace et lavées doucement quelques fois avec de l'eau distillée pour éliminer les débris indésirables et ensuite séchées une nouvelle fois à l'air. Elles ont ensuite été broyées en poudre et conservées dans des bocaux en verre recouverts de papier d'aluminium.

1.1.5. Extraction des polysaccharides

La technique utilisée pour l'extraction des polysaccharides est la « Hot extraction » (Rong, 2010), décrite ci-dessous :

- De la poudre de *Laminaria sp* (40 µg) a été ajoutée à 1,6 µkg d'eau. Le mélange a été agité vigoureusement dans un bain d'eau (80°C) pendant 8 h, suivi d'une centrifugation (4300 rpm, 20 min).
- Le surnageant a été concentré à 1/5 du volume d'origine. Ensuite, cinq fois le volume d'éthanol à 95 % a été ajouté à la solution concentrée. Le mélange d'éthanol a été placé dans un congélateur pendant une nuit, suivi d'une centrifugation (4300 rpm) pendant 10 min. Le

précipité est lavé à l'acétone, essoré puis séché, la poudre de polysaccharides est alors enfin récupérée.

1.2. Matériel animal

1.2.1. Entretien des animaux

Les rats utilisés dans cette expérimentation sont des rats mâles adultes de souche *Wistar*, pesant entre 150 et 175 g, issus de l'élevage au niveau de l'animalerie de l'Université des frères Mentouri de Constantine. nous en avons récupéré le foie pour la réalisation de cette étude.

- Les rats sont logés dans des cages où chaque cage regroupe 5 souris. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture.
- Les rats sont maintenus à une température ambiante.
- Ils ont été traités conformément au principe et directive énoncés dans le manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation.

1.2.2. Induction de l'hépatotoxicité par le paracétamol

L'hépatotoxicité a été induite, en traitant les rats au paracétamol (2g/kg) dissout dans une solution de chlorure de sodium avec une seule dose aiguë qui de 0.9 % administrée par gavage.

1.2.3. Traitement des animaux

L'ensemble des rats ont été divisés en trois groupes de 5 rats chacun :

- **Groupe I (5 rats) : Sains témoins ou contrôle** ; reçoivent chaque jour par gavage 0.4 ml/kg d'eau physiologique.
 - **Groupe II (5 rats) : paracétamol témoin** : reçoivent quotidiennement, par gavage de l'eau physiologique pendant 10 jours, puis au 10^{ème} jour juste après le dernier traitement, ils reçoivent 2g/kg de paracétamol.
 - **Groupe III (5 rats) : paracétamol + Polysaccharides** ; reçoivent quotidiennement, par voie orale 100mg/kg de l'extrait de polysaccharides algaux pendant 10 jours, puis au 10^{ème} jour juste après le dernier traitement, ils reçoivent 2g/kg de paracétamol.
- Après un traitement de 10 jours à l'extrait de polysaccharides algaux, un volume équivalent de chlorure de sodium à 0.9 % a été administré par voie intrapéritonéale aux rats témoins.

1.2.4. Prélèvement sanguin

- Après 3h de l'administration du paracétamol, le sang est prélevé et mis dans des tubes secs. Ces prélèvements ont été effectués, sur des rats à jeun à la fin de l'expérimentation.
- Après le prélèvement sanguin, le sang est mis dans des tubes secs, laissé à température ambiante 1h puis centrifugé à 6000 tours/minute pendant 15 minutes puis le sérum est récupéré et utilisé pour les dosages biochimiques des transaminases (ALT et AST).

1.2.5. Préparation de la fraction cytosolique

Sacrifice des animaux, récupération du foie et préparation de la fraction cytosolique du tissu hépatique :

- Après les 10 jours de traitement, puis l'administration du paracétamol, les rats ont été par la suite sacrifiés par translocation cervicale pour récupérer le foie.
- Le foie est récupéré, rincé par l'eau physiologique saline 0.9 %, puis conservé à 4°.
- Le jour du travail (dosage), 0.5 g de foie est additionné à 3ml de solution tampon Tris-EDTA phosphate 0.1 M pH ; 7.4 contenant du KCl 1,15M, le mélange est homogénéisé à 1200 tours/minute par un homogénéiseur.
- L'homogénat est ensuite centrifugé à 1000 tours/minute pendant 15 minutes à 4C. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 9600 tours /minute pendant 45 minutes à 4C°.
- La fraction cytosolique est récupérée et utilisée pour les dosages du taux de molonyldialdéhyde (MDA), la concentration de glutathion réduit (GSH) et l'activité de la catalase (CAT).



Figure 2: L'homogénat de foie

1.3. Réactifs

L'Acide Thiobarbiturique (TBA), le 1,1,3,3-Tetraoxypropane (TEP), l'Acide Thionitrobenzoïque (DTNB), le Glutathion réduit (GSH) est de chez *SIGMA ALDRICH CO., ST Louis, Mo.*

Le Tris, le KH₂PO₄, le K₂HPO₄ et l'EDTA sont de chez *BIOCHEM., CHEMOPHARMA, Gorgia ; USA.*

Le Trichloroacide Acétique (TCA) est de chez *FLUKA CHEMIKa ; Switzerland.*

Le peroxyde d'hydrogène, et le KCl sont de chez *PANREAC QUIMICA, SA ; Espana*

Le *n*-butanol et acheté de *PROLAB, MERK EUROLAB.*

BSA de *BIOCHEM., CHEMOPHARMA, Gorgia ; USA.*

1.4. Appareillage

- ✓ *Centrifugeuse Sigma.*
- ✓ *pH-mètre Hanna.*
- ✓ *Spectrophotomètre.*
- ✓ *Bain marie.*

2.METHODES

2.1. Méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité de l'extrait de polysaccharides

2.1.1. Evaluation de l'activité protectrice des protéines de l'extrait de polysaccharides

Afin d'étudier la capacité de l'extrait de polysaccharides algaux à prévenir les hépatites causées par un surdosage de l'acétaminophène (paracétamol), nous avons choisi de réaliser le test d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) par la chaleur (72°C) décrit par (**Kandikattu *et al.*, 2013**).

- Nous avons réalisé une gamme de concentrations de l'extrait de polysaccharides algaux, allant de 50 à 400 µg/ml.
- 1ml de chaque dilution est ajouté à 1 ml de la solution BSA à 0.2 % préparée dans du PBS (à pH 6.4, NaCl 0.9%). Enfin, le mélange est incubé pendant 5min à 72°C.
- Ensuite, nous attendons que les tubes refroidissent avant de les passer au vortex, enfin l'absorbance des mélanges est lue à 660nm.
- Nous avons aussi choisi l'aspirine comme anti-inflammatoire de référence, son activité anti-inflammatoire a été évalué dans les mêmes conditions appliquées à nos échantillons.
- Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation thermique a ensuite été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{(\% Protection)} = 100 - (\text{Do échantillon/Do du contrôle}) \times 100$$

Un contrôle (un mélange sans extrait de polysaccharides) a été utilisé pour les calculs.



Figure 3 : Test d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) par la chaleur (72°C)

2.1.2. Préparation de la suspension érythrocytaire

- Le sang prélevé pour la réalisation de nos tests est récupéré dans des tubes héparines à partir de personnes volontaires saines qui n'ont pas de pathologies particulières afin d'éviter toute interférence avec nos résultats.
- Le sang est centrifugé à 3000rpm /5min, le culot récupéré et lavé 3 fois avec la solution PBS iso-saline formée de tampon phosphate de potassium 10mM, pH=7,4 et 154mM de Na Cl. Chaque lavage consiste en une suspension des cellules dans du PBS Iso salin et une centrifugation à 3000rpm/5min.
- Après la dernière centrifugation, le culot est suspendu à nouveau dans une solution du PBS iso-saline, la suspension érythrocytaire est prête (**Rani *et al.*, 2014**).

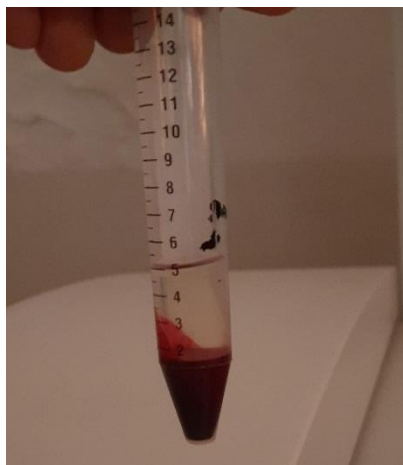


Figure 4: Récupération de la suspension érythrocytaire

2.1.3. Evaluation de la non-toxicité de l'extrait de polysaccharides pour les globules rouges

Avant de passer à l'évaluation de l'activité anti-hémolytique de notre extrait, nous devons au préalable nous assurer de son innocuité vis à vis des GR, selon les étapes suivantes :

1. Une série de concentrations de l'extrait de polysaccharides a été préparée dans un tampon phosphate (pH 7.4 ; 0.9% NaCl) à un hématocrite de 2%.
2. Le mélange a été incubé pendant 10 min à température ambiante, ensuite centrifugé à 2000 rpm à 4° C.
3. Lire l'absorbance du surnageant à 540 nm.
4. Le pourcentage de protection a été calculé en utilisant la saponine (à 1200 µg/ml), c'est notre hémolytique de référence, provoquant 100% d'hémolyse.
5. Un tube sans traitement qui représente le témoin négatif a aussi été préparé, afin d'observer une hémolyse naturelle.

Les pourcentages d'hémolyses de chacune des concentrations utilisées sont calculés suivant l'équation suivante :

$$\text{Hémolyse (\%)} = [\text{DoE} - \text{Doc-} / \text{Doc+}] \times 100$$

DoE : Densité optique de l'échantillon

Doc- : Densité du contrôle négatif

Doc+ : Densité du contrôle positif.

2.1.4. Evaluation de l'activité anti-hémolytique de l'extrait de polysaccharides algaux

L'évaluation de l'activité anti-hémolytique d'un extrait est un très bon indicateur quant à sa capacité à présenter un effet thérapeutique pour plusieurs maladies hémolytiques, inflammatoires ou encore dégénératives comme l'hépatite.

Nous allons donc, inspecter à travers ce test la possible activité anti-hémolytique de notre extrait de polysaccharides algaux, c'est-à-dire sa capacité à prévenir la destruction des globules rouges soumises à un stress osmotique.

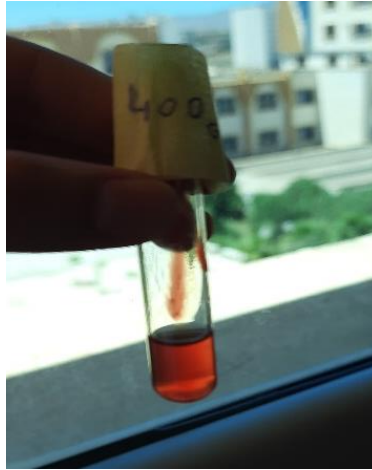


Figure 5 : Le surnageant récupérer pour l'évaluation de l'activité anti hémolytique

2.1.5. Evaluation de l'activité stabilisatrice des membranes des GR par l'extrait de polysaccharides contre un stress osmotique

Certains paramètres physicochimiques tel que le milieu hypotonique, peuvent provoquer la rupture de la membrane cytoplasmique des GR et libèrent par la même occasion leur contenu en hémoglobine.

L'hémoglobine libérée sera dosée à l'aide du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540nm.

1. Nous avons donc commencé par préparer une série des concentrations en NaCl de 0.3%, 0.5%, 0.7 % et 0.9 %.
2. Ensuite, nous avons mélangé 1 ml de la suspension érythrocytaire à 2 % à 1 ml de l'une des concentrations variables en NaCl citées précédemment (préparées dans PBS).
3. Chacune est combinée par la suite à des concentrations variables de l'extrait (50, 100, 200, 300,400 μ g/ml), cela veut dire que chaque concentration de l'extrait sera testée avec les quatre concentrations de NaCl.

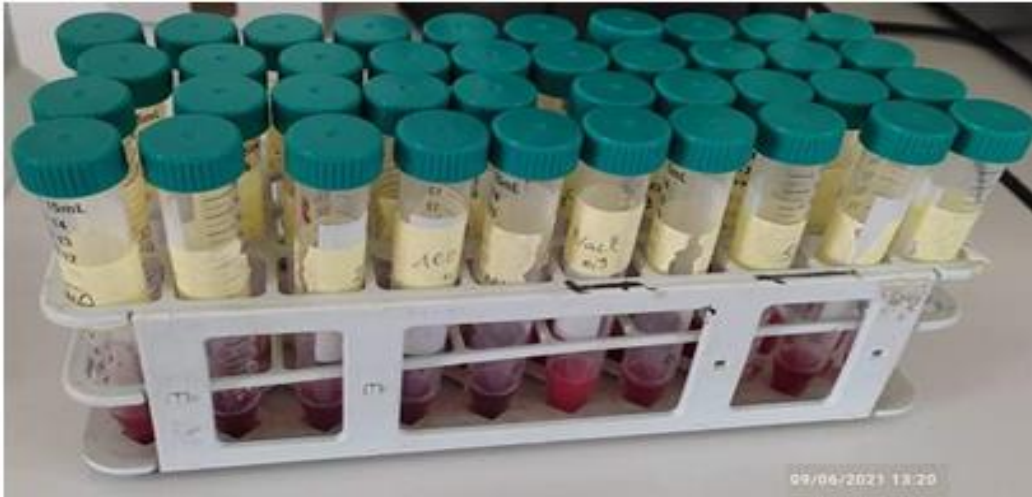


Figure 6: Teste de l'activité stabilisatrice avec différent concentration de l'extrait et de NaCl

2.2. Méthodes de dosage des paramètres biochimiques du sang

Le dosage des paramètres biochimiques a été réalisé de la manière suivante :

2.2.1. Les transaminases

Les transaminases (ou amino transférase) sont des enzymes hépatocytaires dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide alpha aminé à un acide α -cétonique. Il existe 2 transaminases dont le coenzyme est la vitamine B6 (phosphate de pyridoxal) AST et ALT.

➤ Principe

L'évaluation quantitative des transaminases dans le sérum est réalisée en utilisant des kits selon les réactions suivantes :

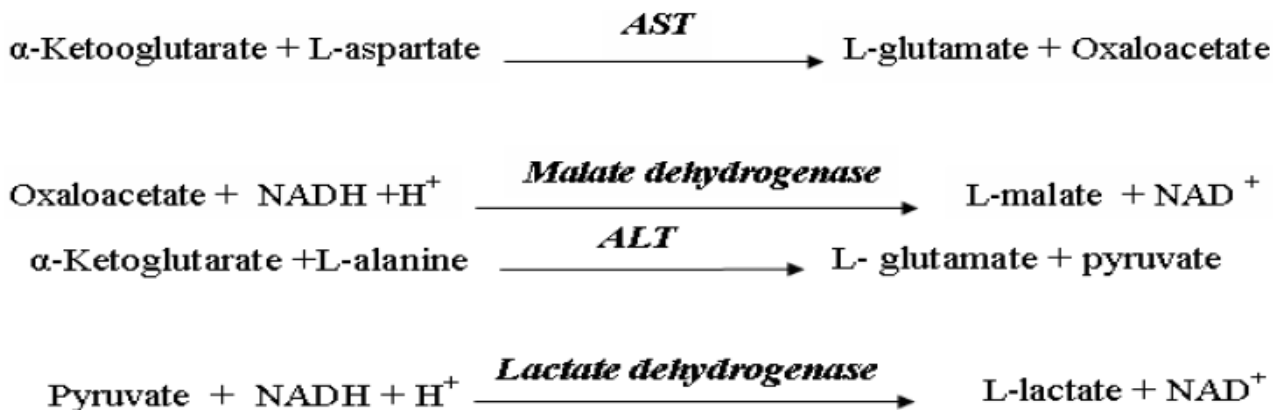


Figure 7 : Les réactions d'évaluation quantitative des transaminases

2.3. Méthodes de dosage des paramètres du stress oxydant

2.3.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) dans une fraction cytosolique de foie

➤ Principe

Le MDA est un dialdéhyde à trois carbones hautement réactifs, produit comme sous-produit de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et du métabolisme de l'acide arachidonique (**Hartman, 1983**).

En tant que l'un des produits secondaires les plus connus de la peroxydation lipidique, le MDA peut être utilisé comme marqueur de lésion de la membrane cellulaire. Des niveaux accrus de produits de peroxydation lipidique ont été associés aux zones inflammées ainsi qu'à une variété de maladies chroniques chez les humains et les modèles animaux (**Lovric et al., 2008**).

Dans notre étude, le taux du MDA hépatique a été évalué selon la méthode d'**Ohkawa et al., (1979)**.

Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100°C), entre le MDA et deux thiobarbituriques (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

➤ Méthode de dosage

1. A 0.5ml de la fraction cytosolique 10% (KCl 1,15M) de foie nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67%.
2. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de *n*-butanol.
3. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/min, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 520 nm.
4. La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nm/gramme de tissu (foie). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1, 1, 3,3-tetraetoxypropane dans les mêmes conditions.



Figure 8 : Les fractions obtenues pour le dosage de MDA

2.3.2. Dosage du glutathion réduit hépatique

Le glutathion, également appelé GSH, est un composant endogène du métabolisme cellulaire, c'est un tripeptide composé de glycine, de cystéine et d'acide glutamique. Il est normalement présent dans le foie à une concentration de 10 mmol⁻¹. Elle fait partie intégrante de la biotransformation des substances xénobiotiques et sert à protéger l'organisme des agents réducteurs (Gad, 2014). Le glutathion se trouve dans la cellule sous deux formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de 99% de la quantité total (Lahouel, 2005).

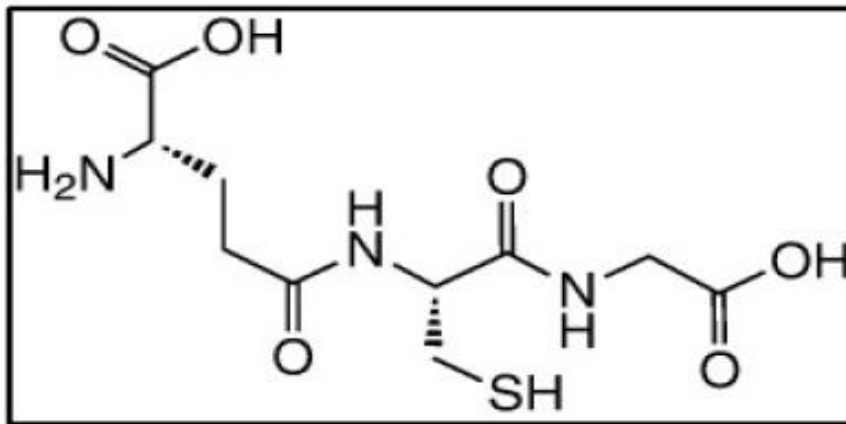


Figure 9 : Formule chimique du Glutathion réduit. (Lahouel, 2005).

➤ Principe

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée (Ellman, 1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 mn selon la réaction suivante :

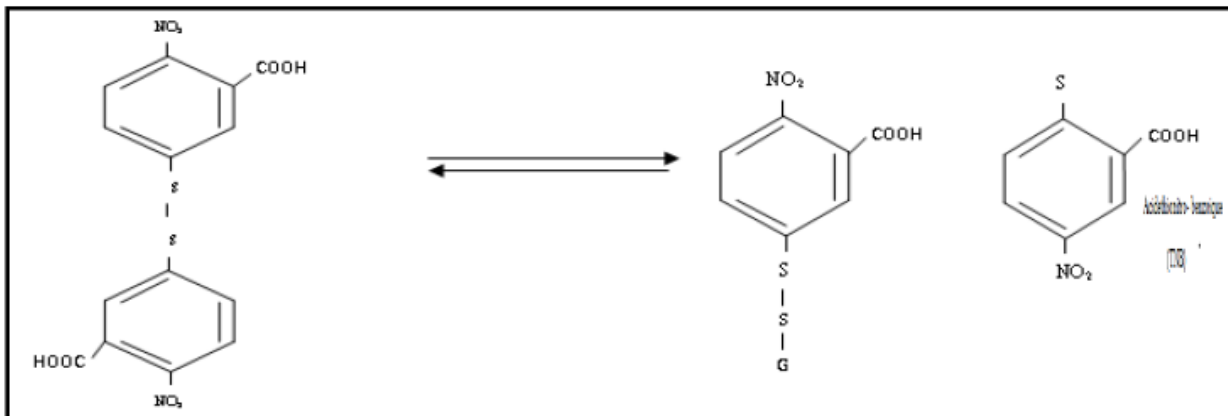


Figure 10 : Réaction d'Ellman (Ellman, 1959).

➤ Méthode de dosage

- 1- A 0.5ml de la fraction cytosolique 10% (KCl 1,15M) du foie nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 10% puis centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes.
- 2- Ensuite, à 1.7 ml du tampon phosphate 0.1 M, pH : 8 nous avons additionné 0.2 ml de surnageant et 0.1 ml du réactif d'**Ellman** 0.1M. La lecture de la densité optique est effectuée après 5 minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 10%.
- 3- Les concentrations du GSH dans l'échantillon sont exprimées en μm /gramme de tissu. Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du GSH dans les mêmes conditions.



Figure 11: Dosage de GSH

2.3.3. Dosage de l'activité de la catalase cytosolique

La catalase est une enzyme dismutase, elle contient une fraction hème au site actif et convertit deux molécules de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, elle est impliquée dans la prévention des dommages cellulaires causés par le stress oxydatif (**Kehrer *et al.*,2010**).

L'activité de la catalase cytosolique est déterminée selon la méthode d'**Aebi, (1984)**. La méthode utilisée est basée sur la propriété de la catalase à dégrader le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (**Aebi,1984**). On effectue une lecture continue du changement d'absorbance à 240nm chaque minute dans un intervalle de temps de 2 minutes.

➤ Principe

Le principe repose sur la disparition de l' H_2O_2 à 25 C° par la présence de la source enzymatique dans la fraction cytosolique.

➤ Méthode de dosage

La méthode utilisée est basée sur la propriété de la catalase à dégrader le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Aebi, 1984). On effectue une lecture continue du changement d'absorbance à 240nm chaque minute dans un intervalle de temps de 2 minutes.



Figure 12 : Dosage de CAT utilisant H₂O₂

➤ Calcule

$$K = \frac{2.303}{T} \times \log \frac{A_1}{A_2}$$

- **K** : Constant de vitesse de la réaction.
- **T** : Intervalle de temps.
- **A1** : Absorbance dans le temps zéro.
- **A2** : Absorbance après une minute.

L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante :

$$U/mg = \frac{K}{n}$$

n : mg de protéines en mg présentent dans le volume de l'échantillon utilisé.

UI/mg de Prot : μ mole d'H₂O₂ consommé/min/mg de protéine.

3.EVALUATION STATISTIQUE

L'évaluation statistique est effectuée par le logiciel *GraphPadPrism 8*. Les valeurs du groupe Témoin et celles des groupes traités par l'extrait de polysaccharides algaux sont analysées par one-way analysis of variance (ANOVA) suivi par Student. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types pour 5 rats dans chaque groupe.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type

n = 5 : Différence non significative P > 0.05 ;

Différence Significative *P < 0.05 ; **P < 0.01.



RESULTATS



II. RESULTATS

1. Evaluation de l'activité d'extrait de polysaccharides *in vitro*

1.1. Évaluation de l'activité protectrice de l'extrait de polysaccharides

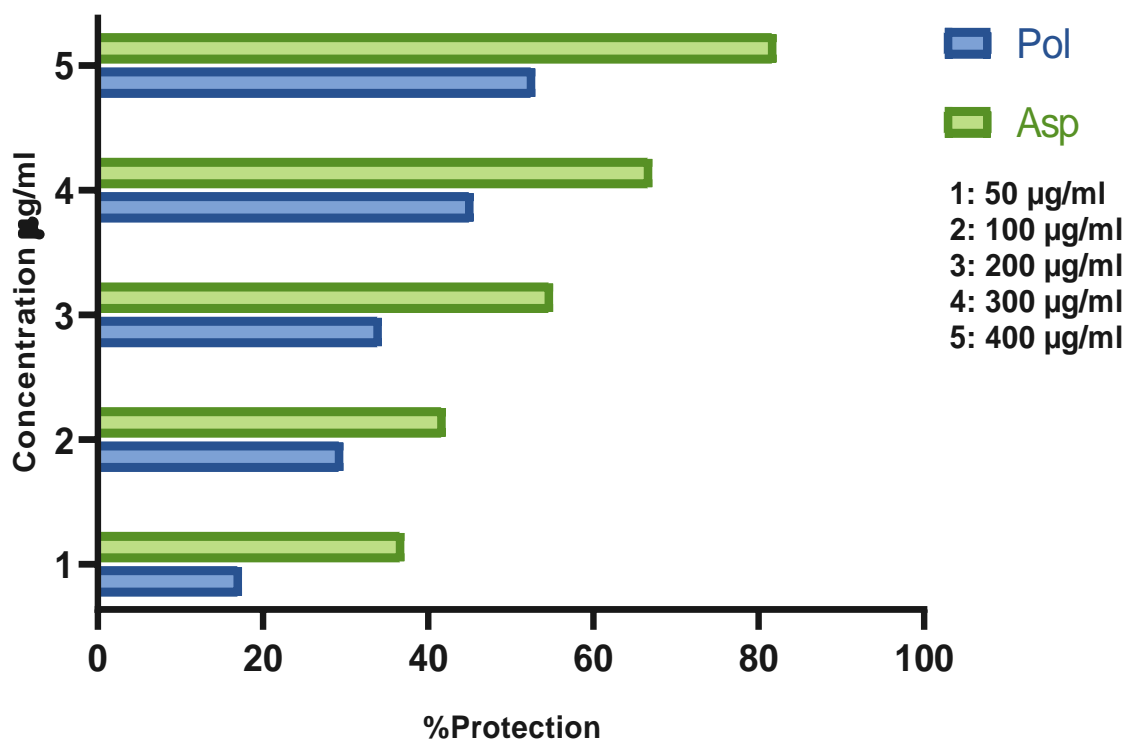


Figure 13: Taux de protection contre la dénaturation thermique du BSA en présence de l'aspirine et de l'extrait de polysaccharides algaux.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 5.

D'après l'histogramme ci-dessus, nous remarquons que le taux de protection de l'extrait de polysaccharides est directement proportionnel à la concentration utilisée, allant de 17.347±2.641%% pour la première concentration (50µg/ml) jusqu'à plus de 52.127±1.927% pour la cinquième (400 µg/ml). Cependant, ces valeurs restent en dessous de celles enregistrées pour l'aspirine qui vont de 37.644±2.562% pour la première concentration de 50 µg/ml jusqu'à 82.197±1.701% pour la cinquième (400 µg/ml).

1.2. Evaluation de la non-toxicité de l'extrait de polysaccharides pour les globules rouges

Le tableau I présente les pourcentages d'hémolyse obtenus après l'incubation des GR avec l'extrait de polysaccharides algaux, les taux ont été calculés en prenant en considération un témoin positif (GR avec saponine) et un témoin négatif (hémolyse naturelle).

Tableau I : Pourcentage d'hémolyse avec différentes concentrations de l'extrait algal.

Concentration de l'extrait (µg/ml)	%Hémolyse
50	1.02%
100	1.66%
200	2.84%
300	4.28%
400	5.91%

1.3. Evaluation de l'activité stabilisatrice des membranes des GR par l'extrait de polysaccharides contre un stress osmotique

Un globule rouge placé dans l'eau pure subit une pression osmotique considérable. En absence de contre-pression appliquée dans le cytoplasme, la solution (hypotonique) diffuse vers l'intérieur de la cellule (hypertonique) à travers la membrane. L'entrée massive d'eau dans l'hématie entraîne le gonflement puis l'éclatement du globule rouge. Ce test nous permet d'évaluer la capacité de notre extrait de polysaccharides algaux à donner une stabilité aux membranes des GR et donc d'éviter leur éclatement par hémolyse. Les résultats obtenus sont exprimés sur le graphique ci dessous :

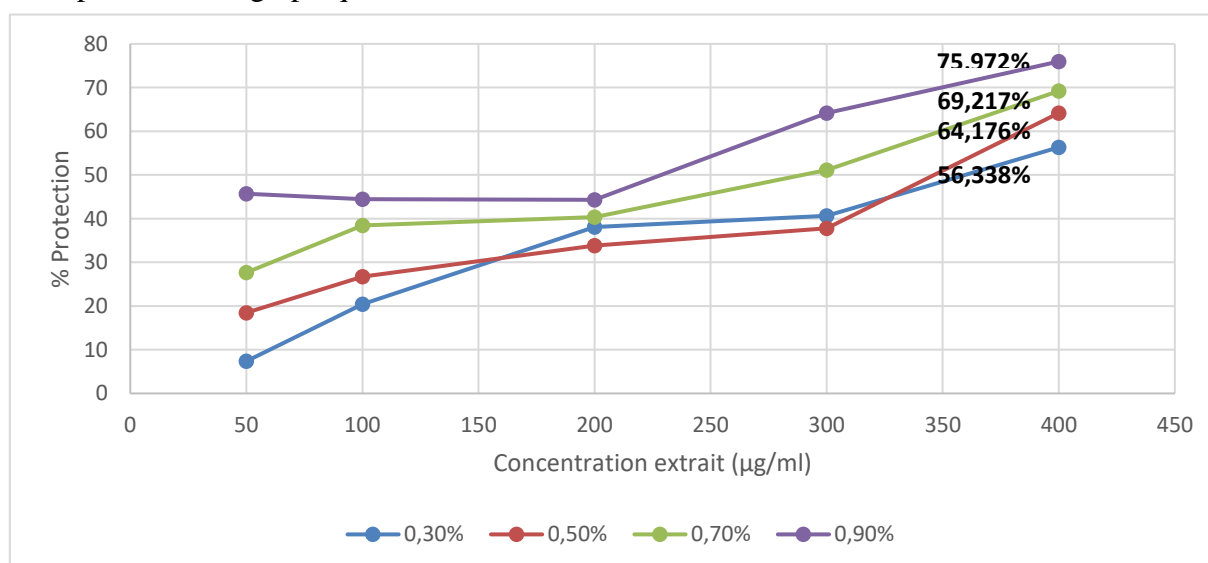


Figure 14: Pourcentage de protection des GR en fonction des concentrations de l'extrait de polysaccharides algaux contre un stress osmotique.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 3.

Nous remarquons que le pourcentage de protection des GR par l'extrait algal augmente proportionnellement avec la concentration de ce dernier ainsi que la concentration de la saline utilisée.

L'activité maximale était enregistrée à une concentration de 400 µg/ml pour donner respectivement 75.972±2.179%, 69.217±1.0113%, 64.176±1.647% et 56.338±1.811% avec les concentrations de la saline suivantes : 0.3%, 0.5%, 0.7 et 0.9%.

Les résultats obtenus sont assez intéressants dans la mesure où elle démontre la présence d'une activité protectrice vis-à-vis des GR contre le stress osmotique et donc prévenir l'hémolyse.

2. Evaluation de l'activité d'extrait de polysaccharides *in vivo*

2.1. Effet de l'extrait de polysaccharides algaux sur les paramètres biochimiques du sang

2.1.1. Transaminases

Les résultats de l'influence d'un traitement de 10 jours par l'extrait de polysaccharides de *Laminaria sp* sur les transaminases chez des rats atteints d'une hépatotoxicité par l'administration de paracétamol sont rassemblés dans le tableau II.

Les résultats obtenus dans notre travail ont montré que l'administration du paracétamol (2g/Kg) a provoqué une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) de la concentration sérique de l'ALT (261,411±22.17 UI /L contre 57,81±5.39 UI /L) et de l'AST (377.281±63.228UI/L contre 118,931±7.33) par rapport au témoin. Cependant l'administration par voie orale de l'extrait de polysaccharides de *Laminaria sp* pendant 10 jours, avec une dose de 100mg/kg a provoqué une baisse significative ($p < 0.05$) de l'ALT (96,762±6,74 UI /L) et de l'AST (200,511±49.61) par rapport au témoin traité par le paracétamol.

Tableau II: résultats de dosage de ALT AST

Groupes	ALT	AST
Control	57,81±5.39	118,931±7.33
Paracétamol	261,411±22.17**	377.281±63.228**
Paracétamol+ Extrait	96,762±6,74**	200,511±49.61**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 3.

ns. : Différence non significative $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.2. Evaluation de l'effet de l'extrait de polysaccharides algaux sur les paramètres du stress oxydant

2.2.1. Effet sur la concentration du molonydialdéhyde (MDA)

La figure 15 représente la variation du taux hépatique en MDA chez les rats traités avec le paracétamol et des rats traités avec le paracétamol plus l'extrait de polysaccharides algaux par rapport aux témoins.

Pour cette étude, La concentration en MDA a été déterminée sur la fraction cytosolique du foie. Nous avons constaté que chez les rats traités par le paracétamol, l'hépatotoxicité provoquée est associée à une peroxydation lipidique exprimée par l'augmentation significative ($P < 0.05$) du taux du MDA au niveau hépatique (148.731 ± 9.555 nmol/g tissu) par rapport au groupe témoin (67.77 ± 3.387 nmol/g tissu). Par contre un traitement de 10 jours par l'extrait de polysaccharides algaux a significativement baissé le taux du MDA à 94.88 ± 3.804 nmol/g tissu par rapport aux témoins traités par le paracétamol seul.

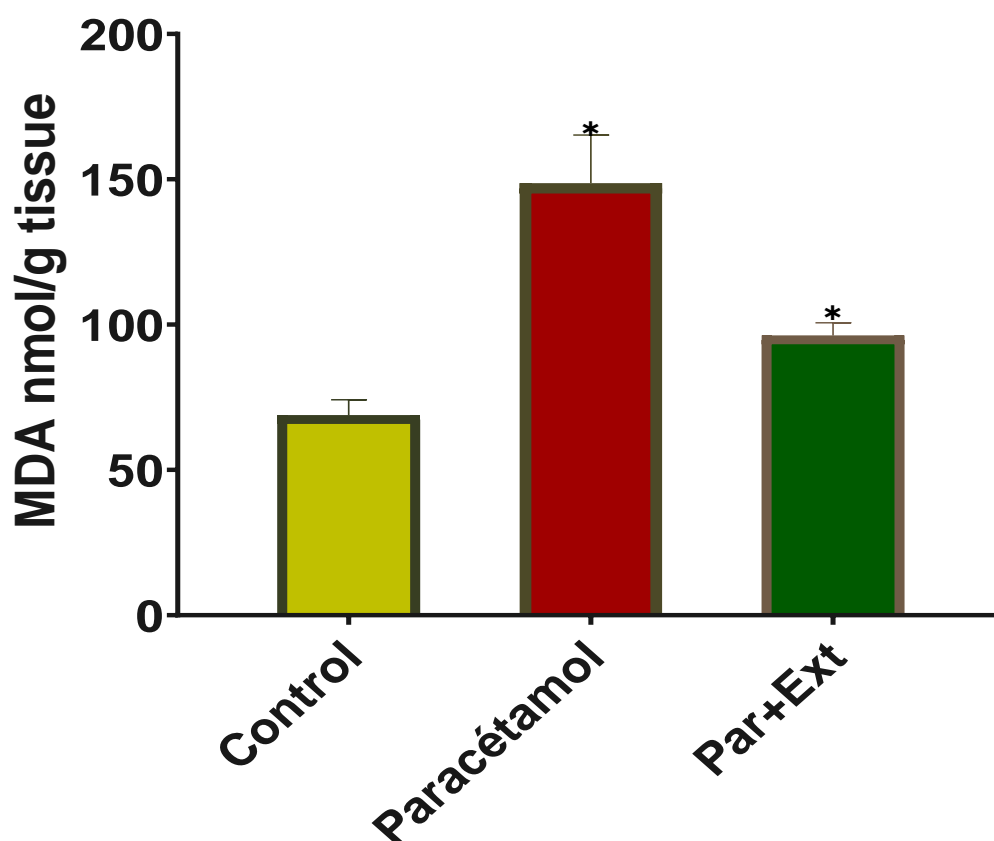


Figure 15: Effet de l'extrait de polysaccharides algaux sur le taux du MDA hépatique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type, $n = 5$.

ns. : Différence non significative $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.2.2. Variation de taux hépatique en glutathion réduit (GSH)

Les résultats de l'étude de l'influence d'un traitement de 10 jours par l'extrait de polysaccharides algaux sur le taux hépatique du GSH sont rassemblés dans la figure 16. Chez les rats traités par le paracétamol, nous avons constaté une diminution significative du taux du GSH hépatique (15.80 ± 2.131 nmol/mg prot) par rapport à celui enregistré chez les témoins sains (40.71 ± 3.035 nmol/mg prot) ($P < 0.05$). Par contre, la déplétion du glutathion réduit (GSH) hépatique causée par le paracétamol a été en partie limitée (24.71 ± 1.598 nmol/mg prot) chez le groupe ayant reçu l'extrait de polysaccharides algaux pendant 10 jours à la dose quotidienne de 100 mg/kg, par rapport au groupe paracétamol ($P < 0.05$).

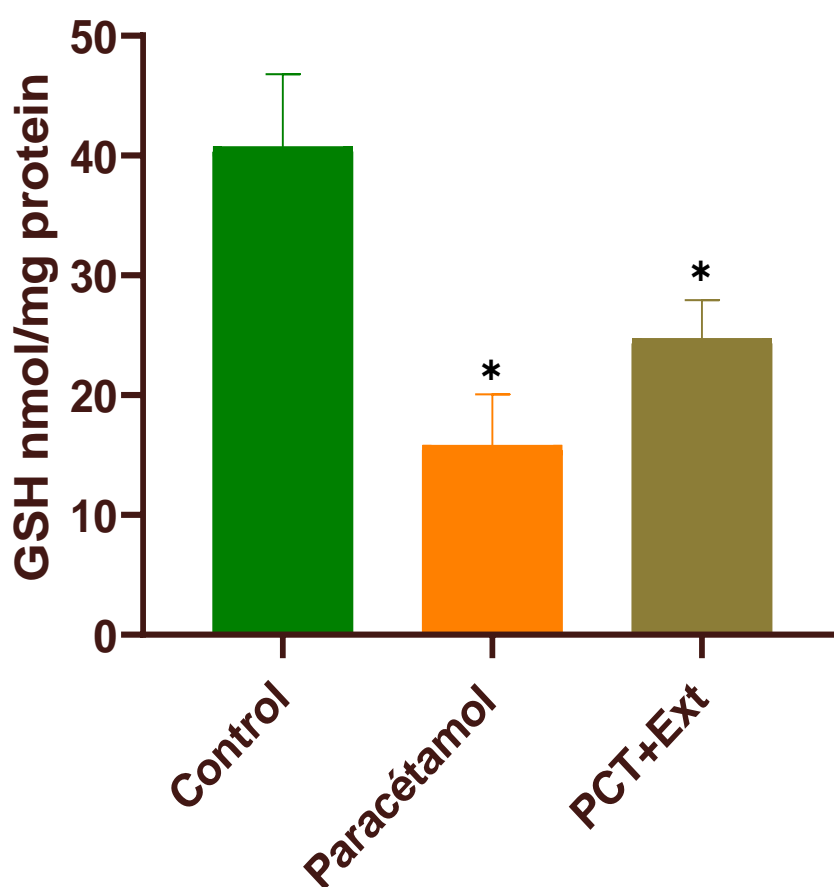


Figure 16: Influence de l'administration de l'extrait de polysaccharides algaux sur la concentration hépatique en GSH

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type, n = 5.

ns. : Différence non significative $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.2.3. Activité de la catalase (CAT) hépatique

L'activité de la catalase a été déterminée sur une fraction cytosolique du foie. La figure 17 présente les résultats de l'influence d'un traitement de 10 jours par l'extrait de polysaccharides algaux sur l'activité de la catalase dans le foie. Dans notre étude nous avons constaté une réduction significative ($P < 0.05$) de l'activité de la catalase au niveau du foie chez les rats traités par le paracétamol (44.90 ± 3.146 nmol/min/mg) par rapport à celles des rats sains témoins (149.9 ± 7.790 nmol/min/mg)

D'autre part, on a constaté que l'administration de l'extrait de polysaccharides algaux (100 mg/Kg) a permis une augmentation significative ($P < 0.05$) de l'activité de la catalase cytosoliques normalement réduite par l'administration du paracétamol. Cette hausse est à l'ordre de (86.48 ± 5.863 nmol/min/mg) mais elle reste cependant encore inférieure à celle des rats sains témoins.

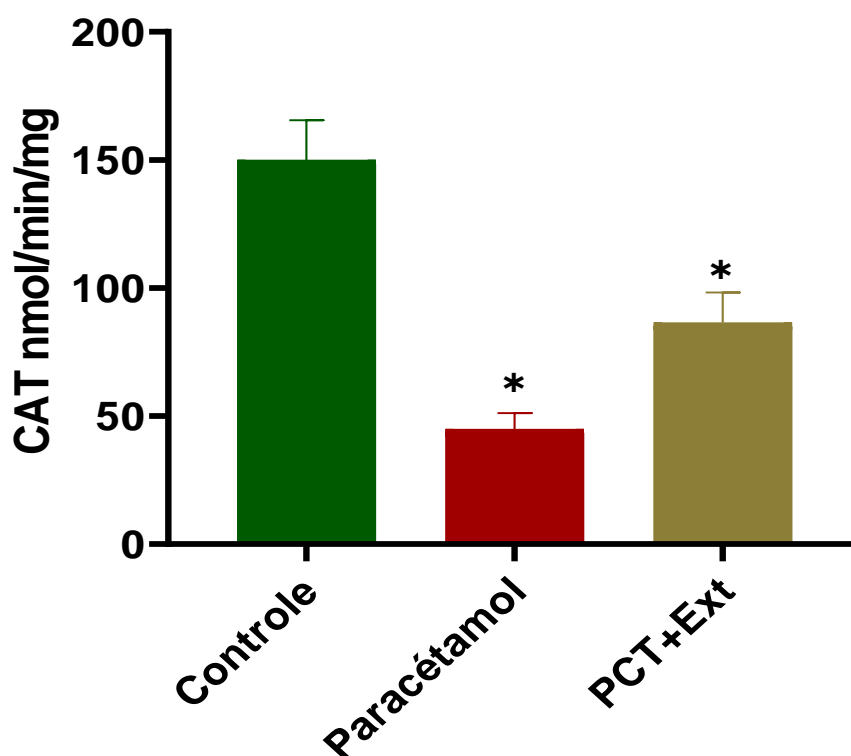


Figure 17: L'effet de l'extrait de polysaccharide algaux sur l'activité de la CAT

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type, $n = 5$.

ns. : Différence non significative $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



DISCUSSION



III. DISCUSSION

Les algues marines représentent une source riche des nouvelles molécules biologiquement actives, elles ont largement été utilisées comme dans l'alimentation ou encore en médecine grâce à leur avantage d'être une matière première moins coûteuse et d'un rendement important en biomolécules bénéfiques avec un potentiel biologique et thérapeutique élevé tel que les polysaccharides, les protéines et les polyphénols algaux, cet avantage a fait l'objet de plusieurs recherches (**Rocha *et al.*, 2007 ; Tabarsa, *et al.*, 2012**). Les polysaccharides ont de nombreuses activités biologiques (anticoagulant, anti thrombose, anti-inflammatoire, anti-insuffisance hépatique, activités antivirales et antitumorales) (**Thompson et Dragar, 2004 ; Maruyama *et al.*, 2006 ; Chevolot *et al.*, 2001**).

Le but de notre travail est d'évaluer les propriétés hépatoprotectrices de l'extrait de polysaccharides de l'algue *Laminaria sp* (**Li *et al.*, 2008**). L'extraction des polysaccharides, réalisée pour notre étude par le laboratoire LBE de l'université de Constantine, est une étape très importante dans l'évaluation de leur pouvoir hépatoprotecteur et antioxydant *in vivo* qui neutralise l'excès des espèces réactives de l'oxygène après une intoxication aiguë induite par un médicament connu pour sa grande toxicité envers le foie, de ce fait, nous avons choisi de récupérer et d'étudier des échantillons traités par le paracétamol (**Leiro *et al.*, 2007 ; Lee et Kim, 2015**). Nous avons aussi commencé notre étude par un ensemble de tests préliminaires *in vitro*.

Le Paracétamol (l'acétaminophène) est un médicament analgésique et antipyrétique couramment utilisé, chimiquement appelé N-acétyl aminophénol (APAP) (**Taviran *et al.*, 2005**). Malheureusement, les cas de surdosage avec cet analgésique commun, qu'ils soient volontaires ou accidentels, sont un motif de recours aux urgences très fréquent et qui causent très souvent des dommages importants au foie. (**Jouet Laëtitia, 2014**).

La toxicité induite par l'acétaminophène est liée à sa bio-activation dans le foie par l'isoenzyme connue sous le nom de CYP2E1 (type d'enzymes cytochrome P-450 (CP450) plus exprimé dans les hépatocytes centrozonales) aux benzoquinoneimines réactives de N-acétyl-p (NAPQI). CYP2E1 montre une activité plus élevée de NADPH oxydase a eu comme conséquence la formation du ROS comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et des radicaux hydroxyles (OH*).

L'acétaminophène est métabolisé dans le foie principalement par le système d'oxydation CP2E1 qui entraîne la formation de NAPQI, qui met en place, par la suite des

liaisons avec le contenu cellulaire comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques, appelés adduits qui peuvent entraîner des lésions ou la mort des cellules hépatiques (**Lee et al., 2002 ; Raghavendran et al., 2005 ; Holt et Ju, 2006 ; Raghavendran et al., 2007 ; Abdelmegeed et al., 2010**).

D'autre part l'interaction de NAPQI avec des thiols d'hépatocyte a eu comme conséquence la rupture de l'homéostasie intracellulaire mitochondriale et qui peuvent causer un dysfonctionnement hépatique supplémentaire, une nécrose hépatique, une hépatite aiguë voire chronique, une fibrose, une cholestase, une stéatose, ainsi que des lésions hépatiques pouvant engendrer une insuffisance hépatique aiguë (**Holt et Ju, 2006 e ; Abdelmegeed et al., 2010**). En plus, les radicaux libres peuvent entraîner une modification des protéines, une peroxydation des lipides, des dommages au niveau de l'ADN et agissent donc comme initiateur ou promoteur de la carcinogénèse (**Tan et al., 2017**).

Les polysaccharides sont des composés qui possèdent des activités antioxydants, anticoagulants, antiviruses, immunomodulateurs et antitumorales, qui semblent dépendre de leurs caractéristiques structurales (**Li et al., 2008**). Leurs potentiels anticoagulants puissants, semblables à l'héparine et anti-hémolytiques avec des mécanismes d'action différents sur l'activation plaquettaire, l'inhibition des facteurs de coagulation et l'action anti-thrombose sont parmi leurs activités les plus importantes (**Rioux, 2010**). **Jin et al., (2014)** ont montré dans leurs recherches que des extraits des polysaccharides des algues brunes tel que *Laminaria sp* augmenterait le niveau de certains anticorps.

La compatibilité sanguine est une caractéristique biologique importante du nouveau matériel biomédical en raison du contact direct avec le sang. D'après **Zaporozhets et Besednova, (2016)** l'interaction entre l'extrait algal, les composants cellulaires et le système immunitaire et hémostatique joue un rôle pathogénique important dans le développement des inflammations. Les cytokines pro-inflammatoires augmentent l'expression du facteur tissulaire de coagulation et inhibent l'activité des anticoagulants naturels, favorisant ainsi la coagulation du sang, la formation de thrombus et donc les perturbations de l'hémostase.

Plusieurs études comme celles de **Lee et al., (2002) ; Rajkappoor et al., (2002) ; Raghavendran et al., (2005) ; Cekmen et al., (2009)** ont été réalisées et des résultats ont été obtenus à partir des tests *in vitro* et *in vivo* montre que les polysaccharides étudiés dans notre extrait algal n'a pas induit des effets secondaires chez les rats, compte tenu des doses standard (**Li et al., 2005**). Les polysaccharides ont démontré une activité anticoagulante et un risque

hémorragique plus faibles que l'héparine (**Durand et al., 2008**). Il serait donc de plus en plus intéressant d'examiner la non-toxicité, la capacité des polysaccharides d'inhiber la dénaturation des protéines et à donner une stabilité aux membranes des globule rouge donc d'éviter leur éclatement par hémolyse (**Vishchuk et al., 2011**).

De ce fait, nous avons alors décidé de commencer notre inspection de l'activité hépatoprotectrice par quelques tests préliminaires *in vitro*, qui peuvent témoigner du potentiel de notre extrait à prévenir les inflammations (hépatite) et donc les dommages hépatocytaires. Nous avons donc choisi le test d'inhibition de la dénaturation du BSA, ainsi que le test d'innocuité de l'extrait vis-à-vis des GR afin de s'assurer de sa non-toxicité et enfin, l'activité protectrice des GR face à un stress osmotique. D'après **Zielhuis et al., (2007)** le test d'hémolyse est considéré comme une mesure fiable et simple pour l'estimation de l'hémocompatibilité, et un pourcentage d'hémolyse inférieur à 5 % est approprié.

L'étude menée par **Osman et al., (2016)** a montré que la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation d'une protéine signifie un potentiel évident d'activité anti inflammatoire, ce qui nous conduit à la relation du test d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) par la chaleur (72°C) au potentiel anti-inflammatoire.

La dénaturation des protéines peuvent entraine une production d'auto-antigènes, causse par la suite des inflammations. Le mécanisme d'inhibition de la dénaturation des protéines à l'aide des anti-inflammatoires à haute température a été décrit par (**Kandikattu et al., 2013**).

Elbayomi et al., (2021) ont montré que 100 à 500 mg/ml d'extrait aqueux des algues brune inhibent la dénaturation de la BSA (bovine serum albumin) induite par la chaleur en fonction de la concentration. Les polysaccharides ont montré une inhibition significativement plus élevée de la dénaturation BSA. Une augmentation du pourcentage d'inhibition a été réalisée lorsque la concentration d'extrait a été augmentée. Il est évident que les polysaccharides inhibent efficacement la dénaturation de la protéine BSA, même à des concentrations plus faibles (100 g/ml). Néanmoins, une inhibition plus élevée de la BSA (40%) a été documentée à 500 g / ml. Nos résultats obtenus sont en accord avec ces résultats démontrent que l'utilisation de 50 à 400 µg/ml l'extrait des polysaccharides d'algue *Laminaria sp* inhibent la dénaturation de BSA de 17.347% jusqu'à 52.12%.

Les recherches de **Celina Maria et al., (2013)** sur l'action cytotoxique de différente concentration d'extrait des polysaccharides d'algue brune sur les différents groupes érythrocytaire ont constaté que l'extrait n'a montré aucune effet cytotoxique (1.5, % jusqu'à

4%), l'absence d'hémolyse significative ($p > 0.05$) sur les érythrocytes, pas de dommages à la membrane érythrocytaire dans les groupes testés.

Selon les études et les résultats de **Faggioe *et al.*, (2015)** sur l'utilisation potentielle de polysaccharides des algues brunes comme anticoagulants, ils ont montré que l'extrait n'a aucun effet cytotoxique sur les globules rouges humains et n'a causé aucune différence significative dans les paramètres hématologiques ($5.11 \pm 10.0 \times 10^6/\mu\text{l}$ de sang). Par contre l'extrait a prolongé significativement le temps de prothrombine (=1%) et le temps de coagulation (>100s).

De plus, les données de **Elbayomi *et al.*, (2021)** ont montré que les polysaccharides de 10 à 100 g/ml stabilisaient la membrane érythrocytaire contre l'hypotonie induisant une hémolyse dépendante de la concentration. Les polysaccharides n'étaient pas significativement toxiques pour les globules rouges, même à des concentrations élevées.

Nos résultats sont concordants, car nous avons constaté que le pourcentage de protection des globules rouges par l'extrait d'algues augmente relativement et l'activité maximale est enregistrée à 400 $\mu\text{g/ml}$ donnant respectivement 75,972%, 69,217%, 64,176% et 56,338% avec les concentrations salines suivantes : 0,3%, 0,5%, 0,7 et 0,9%. Donc notre résultat démontre la présence d'une activité protectrice vis-à-vis des GR contre le stress osmotique et donc prévenir l'hémolyse.

Dans l'autre volet de notre étude, le criblage de l'activité hépatoprotectrice a été aussi réalisé par le dosage de quelques paramètres hépatiques, principalement de stress oxydant (CAT, GSH), mais aussi d'enzymes hépatiques (ALT, AST) qui donnent des indications sur une possible agression au niveau hépatocytaire, mais aussi d'inspecter une éventuelle amélioration chez les rats traités par l'extrait de polysaccharides. Nous avons aussi dosé le taux de MDA hépatique afin de constater le degré de la peroxydation lipidique chez les différents groupes de rats.

D'après les recherches faites par **Zhang *et al.*, (2013)** lorsque le foie est endommagé à la suite de l'administration d'agents infectieux ou de produits chimiques, les taux sériques de ALT et AST augmentent de façon significative. **Fotio *et al.*, (2019)** ont démontré qu'après l'administration des doses répétées d'acétaminophène à des souris, il y avait une augmentation significative ($P \leq 0.01$) de l'activité des enzymes hépatiques ALT et AST.

Nos résultats sont concordants, car nous avons constaté que l'administration d'une dose toxique d'APAP (2g/kg) a significativement ($P \leq 0.05$) augmenté le taux des AST, ALT par rapport aux témoins sains.

En contrepartie, nous avons aussi remarqué une diminution significative ($P \leq 0.05$) des taux de GSH et CAT (15.80 ± 2.131 nmol/mg prot) et (44.90 ± 3.146 nmol/min/mg) respectivement, par rapport à celles des témoins sains (40.71 ± 3.035 nmol/mg prot) (149.9 ± 7.790 nmol/min/mg) respectivement, certain nombre d'études comme **Raj Kapoor et al., (2008)** ; **Yan et al., (2009)** ont mis en cause les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le stress oxydatif induit par le produit final de la métabolisation de paracétamol conjugués avec GSH et qu'a eu comme conséquence l'épuisement du GSH, c'est ce que nous avons observé précédemment dans nos résultats ($P < 0.05$) qui sont conformes à ceux de **Fotio et al., (2019)** qui a constaté que le taux de GSH a été considérablement appauvri par le traitement à l'acétaminophène dans le foie de souris ($P \leq 0.001$) et CAT a été réduit ($P \leq 0.05$).

D'autre part, nos résultats ont montré qu'il y avait une augmentation significative ($P < 0.05$) du MDA au niveau hépatique ($148.7.31 \pm 9.555$ nmol/g tissu) par rapport au groupe témoin (67.77 ± 3.387 nmol/g tissu). Par contre un traitement de 10 jours par l'extrait de polysaccharides algaux a significativement baissé ($P \leq 0.05$) le taux du MDA à 94.88 ± 3.804 nmol/g tissu par rapport aux témoins traités par le paracétamol seul. Le MDA (malondialdéhyd) est l'un des produits finaux de la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans les cellules.

Fotio et al., (2019) ont constaté dans leurs travaux que l'administration d'acétaminophène a entraîné une augmentation significative ($P \leq 0.05$) de la peroxydation lipidique, évaluée par le taux de MDA dans l'homogénat de foie presque jusqu'à ($12 \mu\text{mol/g}$ tissu), par rapport au groupe témoin sain ($5 \mu\text{mol/g}$ tissu).

Au cours des dernières années, un certain nombre d'œuvres et des nombreux chercheurs tels que **Cui, (2016)**, ont étudié les activités antioxydantes des polysaccharides issus des algues brunes et ont déjà révélé que les polysaccharides des algues brunes en général ont une forte activité de récupération des radicaux libres et une capacité de réduction et ils ont démontré une efficacité élevée de neutralisation des ROS.

De plus, les polysaccharides ont également de fortes activités de chélation et de réduction des ions ferreux issu d'activité des cytochromes qui peut inhiber le stress oxydatif en régulant à la baisse le niveau de MDA (**Wang et al., 2014**).

Kawano et al., (2007) ont signalé que l'extrait des polysaccharides issu des algues brunes tel que *laminaria digitata* a la capacité de supprimer le dysfonctionnement hépatique. Et ont prouvé que les polysaccharides peuvent réduire les niveaux des marqueurs de peroxydation lipidique comme le MDA et augmenter les niveaux du GSH et de CAT, réduisant finalement les dommages oxydants provoqués par APAP, ce qui laisse dire que cet extrait pourrait donc également inhiber la production de ROS par la régulation du système de défense antioxydant.

L'étude de **Begum et al., (2021)** a révélé que ces polysaccharides issus des algues brunes régulent l'activité de l'antioxydant enzymatique dans le foie la CAT en activant le voie de signalisation, inhibant la peroxydation lipidique, réduisant TNF- α , puis inhibant le stress oxydatif dans le foie (**Begum et al.,2021**).

Même constat chez **Azam et al., (2021)** qui ont constaté que les rats intoxiqués (par CCL4) traités avec l'extrait de polysaccharides d'algue brune *P. pavonia* ont diminué l'ALT (62,0 %), l'AST (49,0 %) et MDA (57,4%), avec une augmentation des activités antioxydantes hépatiques d'enzymes à savoir ; CAT (18,5%) avec l'amélioration de la concentration hépatique en GSH (141,5%). D'autre part, **Feiwei Yan et Haitao Hao, (2016)** ont montré que les souris soumises au test de nage forcée (provoquer un stress oxydatif) traitées avec l'extrait d'algues *laminaria japonica*, ont eu à une diminution du taux de MDA dans le foie ($p < 0,05$), tandis que les taux de GSH et CAT étaient significativement plus élevés jusqu'à 83,04 %.

Pour finir, nos résultats sont en accord avec tout ce qui a été cité précédemment, car nous avons constaté que l'utilisation de concentration d'extrait de polysaccharides de 100 mg/kg avait provoqué une baisse significative de taux du l'ALT, l'AST et MDA jusqu'à (96,762 \pm 6,74 UI /L), (200,511 \pm 49.61) et (94.88 \pm 3.804 nmol/g) respectivement. En parallèle, nous avons constaté l'augmentation de la défense antioxydante principale qui protège contre le stress oxydatif jusqu'à (24.71 \pm 1.598 nmol/mg prot) pour la GSH et (86.48 \pm 5.863 nmol/min/mg) pour la CAT, par rapport aux témoins traités par le paracétamol seul.

Au regard de tous les résultats susmentionnés, les perturbations des paramètres hépatiques ne peuvent s'expliquer que par des séquelles et des changements inflammatoires dégénératifs au niveau du foie, de l'infiltration leucocytaire, de la peroxydation lipidique voire de la nécrose. Nos résultats ont montré que les paramètres biochimiques pathologiques du foie des rats traités par les extraits des polysaccharides algaux ont été grandement améliorés par rapport aux témoins traités par le paracétamol seul. En outre, les résultats obtenus nous laissent penser que les polysaccharides algaux améliorent et protègent partiellement des effets

indésirables de ce médicament (acétaminophène) en réduisant le stress oxydatif, cela s'est observé par une diminution de MDA, et avec une augmentation significative du taux de GSH et CAT. On peut alors s'avancer à dire que les polysaccharides issus de l'algue brune *laminaria sp* possèdent effectivement une activité protectrice, contre la toxicité du foie causé par l'acétaminophène chez les rats. Cependant, d'autres tests sont nécessaires afin de mettre en lumière les différents constituants de ces polysaccharides (composition osidiques, conformation...) dans le but d'expliquer avec plus de certitudes leurs cibles et leurs mécanismes d'action.



Conclusion et perspectives



Conclusion et perspectives

En conclusion, l'ensemble de nos travaux a permis de mettre l'accent sur l'effet hépatoprotecteur de l'extrait des polysaccharides issus de l'algue brune *Laminaria sp* contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol. Nous avons constaté que les rats témoins traités par le paracétamol seul ont montré une augmentation significative des résultats des dosages biochimiques des transaminases ALT, AST et de MDA avec une diminution de taux de GSH et de CAT. D'autre part, les résultats montrent clairement que le prétraitement par l'extrait a pu minimiser les dommages cités, provoqués par le paracétamol.

Actuellement, il existe plusieurs polysaccharides qui peuvent être considérés comme éléments clé dans plusieurs domaines avec différents usages, comme la pharmacologie, les biomatériaux, l'alimentation, le cosmétique ...etc. et ce grâce à leurs propriétés antioxydante, anticoagulantes, antithrombotiques, antitumorale, antibiotiques et anti-inflammatoires...etc.

Par ailleurs, les résultats de notre étude restent préliminaires et ne constituent qu'une première étape, dans la mesure où d'autres tests sont nécessaires, afin de mettre en lumière les différents constituants de ces polysaccharides (composition osidiques, conformation...) dans le but d'expliquer avec plus de certitudes leurs cibles et leurs mécanismes d'action.

Références bibliographiques

A

- **Abdelmegeed M., Moon K., Chen C., Gonzalez F., Song B., (2010):** Role of cytochrome P4502E1 in protein nitration and ubiquitin- mediated degeneration during acetaminophen toxicity. *Biochemical Pharmacology*. (79) 57-66.
- **Abdel-Rahman MK., El-Megeid AAA., (2006).** Hepatoprotective effect of soapworts (*Saponaria officinalis*) pome granate Peel. (*Punica granatum L.*) and cloves (*Syzygium aromaticum L.*) on mice with CCl₄ hepatic intoxication. *World. J Chem.* ;1 :41–6.
- **Aebi H., (1984).** Catalase. In: Packer, L. ed. *Methods in enzymol. Academic press, Orlando.*, **105**: 121-126.
- **Azam M., Hira K., Qureshi SA., Khatoon N., Ara J., Ehteshamul-Haque S., (2021).** Ameliorative effect of marine macro-algae against carbon tetrachloride (CCl₄) induced hepatic fibrosis and associated complications in rats Original. *Turk J Pharm Sci Article*.

B

- **Begum Rahima., Howlader Saurav., A. N. M. Mamun-Or-Rashid., S. M. Rafiquzzaman., Ghulam Md Ashraf., Ghadeer M., Albadrani., Amany A., Sayed., Ilaria Peluso., Mohamed M., Abdel-Daim., and Md. Sahab Uddin., (2021).** Antioxidant and Signal-Modulating Effects of Brown Seaweed- Derived Compounds against Oxidative Stress-Associated Pathology. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Art, 22 pages.

C

- **Casotti, V., Antiga, L.D., (2019).** Basic principles of liver physiology. In *Pediatric Hepatology and Liver Transplantation*; D'Antiga, L., Ed.; *Springer International Publishing*: New York City, NY, USA; pp. 21–39.
- **Cekmen M., Ilibey y., Ozbek E., Simsek A., Somay A., Ersoz C., (2009).** Curcumin prevents oxidative and renal damage induced by acetaminophen. *Food and chemical toxicology*. (47) 1480- 1484.
- **Celina Maria., Guerra Dorea., Monique Gabriela das., Faustino Alvesa., Luiza Sheyla., Pofírio Willa., Thiago., Costaa Diego., Sabryb., Leonardo Augusto., Souza Rêgoa., Camila., Accardob., Hugo Alexandre., Rochaa., Luciana Guimarães., Filgueira., Edda Lisboa Leite., (2013).** A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers* **91**, 467– 475
- **Chen X., Zhang J., Yi R., Mu J., Zhao X., Yang Z., (2018).** Hepatoprotective Effects of *Lactobacillus* on Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 2212.
- **Chevolot L., Mulloy B., Ratiskol J., Collic Jouault S., (2001).** “A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae.”, *Carbohydr. Res.* **330**. 529–535.
- **Cui Chun., Lu Jianghong., Dongxiao Sun-Waterhouse., Lixia Mu., Weizheng Sun., Mouming Zhao., Haifeng Zhao., (2016).** Polysaccharides from *Laminaria japonica*: Structural characteristics and antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology* **73** 602-608.

E

- **Elbayomi S.M., Wang H., Tamer T.M., You Y., (2021).** Enhancement of Antioxidant and Hydrophobic Properties of Alginate via Aromatic Derivatization: Preparation, Characterization, and Evaluation. *Polymers*, **13**, 2575.
- **Eric Durand., Dominique Helley., Ayman Al Haj Zen., Céline Dujols., Patrick Bruneval., Sylvia Collic-Jouault., Anne-Marie Fischer., Antoine Lafont., (2008).** Effect of low molecular weight fucoidan and low molecular weight heparin in a rabbit model of arterial thrombosis. *Journal of Vascular Research*; **45**:529–537 .

F

- **Faggio Caterina., Morabito Marina., Simona Armeli Minicante., Giada Lo Piano., Pagano Maria., Genovese Giuseppa., (2015).** Potential Use of Polysaccharides from the Brown Alga *Undaria pinnatifida* as Anticoagulants. *Brazilian archives of biology and technology An International Journal* **58**, 798-804.
- **Feiwei Yan., Haitao Hao., (2016).** Effects of *Laminaria japonica* polysaccharides on exercise endurance and oxidative stress in forced swimming mouse model. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*. **23** :7
- **Fotio A., L Nguepi., M S D., Tonfack L., B Temdie., R J G., Nguielefack T B., (2019).** Acetaminophen induces liver injury and depletes glutathione in mice brain: Prevention by Moringa oleifera extract. *South African Journal of Botany*. **58**, 798-804.

G

- **Gad SC., (2014).** Glutathione. Encyclopedia of toxicology.; p 751.
- **Gong S., Lan T., Zeng L., Luo H., Yang X., Li N., Chen X., Liu Z., Li R., Win S., (2018).** Gut microbiota mediates diurnal variation of acetaminophen induced acute liver injury in mice. *Journal of Hepatology.*, **69**, 51–59.

H

- **Hartman PE., (1983).** Review: putative mutagens and carcinogens in foods. Malonaldehyde. *Environ Mutagen* **1983** ;5 :603_7.
- **Holt., ju., (2006).** Mechanisms of drug induced liver injury. *AAPS Journal* (**8**) No. 1 48-54.
- **Huo Y., Yin S., Yan M., Win S., Aung-Thant T., Aghajan M., Hu H., Kaplowitz N., (2017).** Protective role of p53 in acetaminophen hepatotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, **106**, 111–117.

I

- **Isabelle GOUJON., (2004).** Les Alginate : excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique Application à la synthèse d'un gel chimique, Université Henri Poincaré - Nancy I, 155 P.

J

- **Janvier 2011,** Description de *Laminaria digitata*, <http://www.mer-littoral.org/62/laminaria-digitata.php>.
- **Jin Heo S., Ju Park E., Wan Lee K., Jin Jeon Y., (2005)** Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource technology* (**96**) Issue 14.
- **Jin JO., Zhang W., Du JY., Wong KW., Oda T., Yu Q., (2014).** Fucoidan can function as an adjuvant *in vivo* to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. *PLoS One*, **9**, e99396.
- **Jiu Deng., Wenbo Wei 1., Zongzheng Chen., Bingcheng Lin., Weijie Zhao., Yong Luo., Xiuli Zhang., (2019).** Engineered Liver-On-A-Chip Platform to Mimic Liver Functions and Its Biomedical Applications, **10(10)**, 676.
- **Jouet Laëtitia., (2014).** Thèse pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie, Toxicité du paracétamol : résultats d'une étude multicentrique relative aux intoxications volontaires au paracétamol dans les SAU adultes français. Enjeux de la libéralisation du paracétamol. Sous la direction de M. Callahan Jean-Christophe et M. Clere Nicolas.université angers. <https://dune.univ-angers.fr/fichiers/20062463/2014PPHA3341/fichier/3341F.pdf>

K

- **Kandikattu K., Bharath RKP., Venu PR., Sunil KK., Ranjith Singh BR., (2013).** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by *in-vitro* method. *Indian J. Res. Pharm. Biotech.* **1(5)**, 729-730.

- **Kawano N., Sanada EY., (2007).** Effect of dietary fiber in edible seaweeds on the development of D-Galactoseamine-induced hepatopathy in rats. *J Nutr Vitaminol. A* ;**53** :446–50.
- **Kawano N., Egashira Y., Sanada H., (2007).** Effects of various kinds of edible seaweeds in diets on the development of D-galactosamine induced hepatopathy in rats. *J Nutr Sci Vitaminol. B* ;**53** :315-23.
- **Kehrer J.P., Robertson J.D., Smith C.V., (2010).** *Comprehensive toxicology*.**1**: 277-307.

L

- **Lahouel M., (2005).** Interaction Flavonoïdes-Mitochondrie et rôle de la Propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. *Thèse de Doctorat Université de Constantine*.
- **Lee J.H., Kim G.H., (2015).** Evaluation of antioxidant activity of marine algae-extracts from Korea. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, **24**, 227–240.
- **Lee S.C., Chun C., Chen J.G., Geng J., Ching C., Shin M.L., (2002).** Effects of "Chinese yam" on hepatonephrotoxicity of Acetaminophen in rats. *Acta Pharmacol Sin* (**23**) No.6 503-508.
- **Leiro JM., Castro R., Arranz JA., Lamas J., (2007).** Immunomodulating activities of acidic sulfated polysaccharides obtained from the seaweeds *Ulva rigida* C. *Agardh. Int Immunopharmacol.* ;**7** :879–88.
- **Li B., Lu F., Wei X., Zhao R., (2008).** Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules.* ;**13** :1671–95.
- **Li N., Zhang Q., Song J., (2005).** Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* (**43**) 421–426.
- **Lovric J., Mesic M., Macan M., Koprivanac M., Kelava M., Bradamante V., (2008).** Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Period Biol* ; **110** :63_7.

M

- **Maruyama H., Tamauchi H., Iizuka M., Nakano T., (2006).** “The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu), *Planta Med.* **72**. 1415–1417.
- **McGill M.R., Sharpe M.R., Williams C.D., Taha, M., Curry S.C., Jaeschke H., (2012).** The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J. Clin. Investig.*, **122**, 1574–1583.
- MEER, et SPA/RAC-ONU Environnement/PAM, 2018. Programme national de surveillance de la biodiversité et les espèces non-indigènes marines en Algérie, Abdelhafid Chalabi. Ed SPA/RAC-Projet EcAp-Med II, Tunis, 167 p.

O

- **Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., (1979).** Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95** : 351–358.
- **Olesya S., Vishchuk Svetlana P., Ermakova Tatyana N., Zvyagintseva., (2011).** Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydrate Research* **346**. 2769–2776.
- **Osman N.A.R., Mohammed S.E., (2016).** A compiled checklist of seaweeds of Sudanese Red Sea coast. *Journal of Coastal Life Medicine* **4**(2): 114-120, 1 table.

Q

- **Quanbin Z., Zhein L., Gefei Z., Xizhen N., Hong Z., (2003).** “Immunosuppressive activities of fucoidan from *Laminaria japonica*.” *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. **21**(4). 324-328.

R

- **Raghavendran HB., Sathivel A., Yogeeta RSSK., Devaki T., (2007).** Efficacy of Sargassum polycystum (Phaeophyceae) sulphated polysaccharide against paracetamol induced DNA fragmentation and modulation of membrane-bound phosphatases during toxic hepatitis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* ;**34** :142–7.
- **Raghavendran B. H., Sathivel A. and Devaki T., (2005).** Effect of Sargassum polycystum (Phaeophyceae)-sulphated polysaccharide extract against acetaminophen-induced hyperlipidemia during toxic hepatitis in experimental rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* (**276**) 89-96.
- **Raj Kapoor B., Venugopal Y., Anbu J., Harikrishnan N., Gobinath M., (2008).** And Ravichandran, V., Protective effect of Phyllanthus polyphyllus on acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Pak. J. Pharm. Sci.*, **21**, 57-62.
- **Rajkappoor B., Jayakar B., Kavimani S., (2002).** Effect of dried fruits of caricapapayalinn on hepatotoxicity. *Biol Pharm Bull.* (**25**) 1645-6.
- **Rasmussen RS., Morrissey MT., (2007).** Marine biotechnology for production of food ingredients. *Adv Food Nutr Res.* ;**52** :237–92.
- **Rani A A., S M J Punitha., M Rema., (2014).** "Anti-inflammatory activity of flower extract of Cassia auriculata-an *in vitro* study." *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.* **4** : 57-60.
- **Reid A.B., Kurten R.C., McCullough S.S., Brock R.W., Hinson, J.A., (2005).** Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 509–516.
- **René PEREZ., (1971).** Écologie, croissance et régénération Teneurs en acide alginique de LAMINARIA digitata sur les côtes françaises de LA MANCHE.
- **Rioux L.E., Turgeon S.L., Beaulieu M., (2010).** Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicruris*. *Phytochemistry* ,**71**, 1586–1595
- **Rocha FD., Pereira RC., Kaplan MAC., Teixeira VL., (2007).** Natural products from marine seaweeds and their antioxidant potential. *Braz. J. Pharmacogn.* **17**, 631-639 | 18.
- **Rong L., (2010).** “Extraction, purification and anti-tumor activity of polysaccharide from mycelium of mutant *Cordyceps militaris*,” *Advanced Chemistry Research*, pp. 798–802.
- **Ross V., Joven A., Donnie RJ., Marianne M., Katherine P., Carla P., Charm P., Jose P., (2012).** Hepatoprotective effects of aqueous sulfated polysaccharide extract from *Sargassum siliquosum* J.G. Agardh on paracetamol-induced oxidative liver toxicity and antioxidant properties. *Int J Pharm Front Res.* **.2** :15–27.

S

- **Samee H., Li ZX., Khalid J., Guo YC., (2009).** Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *J Zhejiang Univ Sci B.* ;**10** :147–53.
- **Sang-Won Hong., Hee-Seung Lee., Kyung Hee Jung., Hyunseung Lee., Soon-Sun Hong., (2012).** Protective Effect of Fucoidan against Acetaminophen-Induced Liver Injury Department of Biomedical Sciences and NCEED, School of Medicine, Inha University, Incheon 400-712, Korea. *Arch Pharm Res.* **35**, 6, 1099-1105.
- **Singh U.K., Agarwal K.N., Shankar R., (1990).** Effect of under nutrition on succinate dehydrogenase and acetylcholine esterase in developing rat brain. *Ind. J. Exp. Biol.* (**28**) 868– 870.

- **Smaher M., Elbayomi Haili Wang., Tamer M., Tamer and Yezi You., (2021).** Enhancement of Antioxidant and Hydrophobic Properties of Alginate via Aromatic Derivatization: Preparation, Characterization, and Evaluation. *Polymers*, **13**, 2575.

T

- **Tabarsa M., Rezaei M., Ramezanpour Z., Waaland JR., (2012).** Chemical composition of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *J Sci Food Agric.* ;**92**:2500–6.
- **Tan S., Lu Q., Shu Y., et al., (2017).** Iridoid Glycosides Fraction Isolated from *Veronica ciliata* Fisch. Protects against Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 6106572.
- **Tatyana Zaporozhets., Natalia Besednova., (2016)** Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system, *Pharmaceutical Biology*, **54**:12, 3126-3135.
- **Tavian M., Peault B., (2005).** Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol.*; **49**:243–50.
- **Thompson K.D., Dragar C., (2004).** “Antiviral activity of *Undaria pinnatifida* against Herpes simplex virus.”, *Phytother. Res.* **18**. 551–555.

V

- **Vishchuk OS., Ermakova SP., Zvyagintseva TN., (2011).** Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydr Res.* Pages 2769-2776.

W

- **Wang F., Liu J.C., Zhou R.J., Zhao X., Liu M., Ye H., Xie M.L., (2017).** Apigenin protects against alcohol-induced liver injury in mice by regulating hepatic CYP2E1-mediated oxidative stress and PPARalpha-mediated lipogenic gene expression. *Chem. Biol. Interact.*, **275**, 171–177.
- **Wang Q., Song Y., He Y et al., (2014).** Structural characterisation of algae *Costaria costata* fucoidan and its effects on CCl4- induced liver injury, *Carbohydrate Polymers*, **107**, 247–254.
- **Wisniewski J.R., Vildhede A., Norén A., Artursson P., (2016).** In-depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes. *J. Proteomics*, **136**, 234–247.

Y

- **Yan S. L., Wu S. T., Yin M. C., Chen H. T., Chen H. C., (2009).** Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen- induced liver injury. *J. Food Sci.*, **74**, H259- 265.
- **Yang W., Yoon S.Y., Jin Oh S., Kim S.K., Kang K. W., (2006).** Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **346**: 345-350.

Z

- **Zhang S., Lu B., Han X., Xu L., Qi Y., Yin L., Xu Y., Zhao Y., Liu K., Peng J., (2013).** Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Food Chem Toxicol.* ;**55** :60–9.

- Zielhuis S.W., Nijssen J.F.W., Seppenwoolde J.-H., Bakker C.J., Krijger G.C., Dullens H.F., Zonnenberg B.A., Van Rijk P.P., Hennink W.E., Schip A.D.V.H., (2007) Long-term toxicity of holmium-loaded poly (l-lactic acid) microspheres in rats. *Biomaterials*, **28**, 4591–45.

