

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
& DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

CENTRE UNIVERSITAIRE DE JIJEL
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme d'études supérieures en Biologie
Option: Biochimie

THEME

EVALUATION DE LA TOLERANCE
CUTANEE ET HEMATOLOGIQUE
DES EXTRAITS D'ALGUES MARINES

Présenté par :

BEGHOUL Ziad
BOURFIS Toufik

Encadré par:

Dr LAHOUEL Mesbah

Promotion Septembre 2002

Dédicaces

*A mes Parents,
A mes frères et sœurs,
A toute ma famille et à tous mes amis,*

*je dédie ce travail
Ziad.*

Dédicaces

*A mes Parents,
A mes frères et sœurs,
A toute ma famille et à tous mes amis,*

*je dédie ce travail
Toufik.*

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance au Dr Lahouel Mesbah de nous avoir confié ce travail.

Nous le remercions pour son entière disponibilité et ses précieuses suggestions.

Nous remercions vivement le président et les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de juger notre travail.

Un grand merci à Monsieur Azizi Hocine président de la ligue de sauvetage, de secourisme et des activités subaquatiques de la wilaya de Jijel pour son aide précieuse.

Nous tenons à remercier également toute l'équipe du laboratoire centrale de l'hôpital de Jijel, ainsi que l'équipe du laboratoire de biologie du centre universitaire de Jijel, pour leur aide

Enfin, nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION:	01
II- ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE:	02
II-1- Rappel général d'hématologie.....	02
II-1-1- L'hématopoïèse.....	02
II-1-2- Les éléments figurés du sang.....	02
II-2- Substances à action toxique sur le sang.....	04
II-2-1- Les médicaments.....	04
II-2-2- Les métaux lourds et autres substances.....	05
II-3- Rappel de toxicologie cutanée.....	05
II-3-1- Les substances à action toxique sur la peau et la muqueuse.....	05
II-3-2- Les modifications physiopathologiques du derme.....	06
II-3-2-1- Les lésions cutanées.....	06
II-3-2-2- Eczémas.....	06
II-4- Les algues marines.....	07
II-4-1- Les algues, sources de médicaments.....	07
II-4-2- Classifications.....	07
II-4-3- Intérêt thérapeutique et autres.....	08
II-4-4- Les risques des algues marines.....	09
III- MATERIEL ET METHODES:	10
III-1- Matériel:.....	10
III-1-1- Les différents types d'algues marines.....	10
III-1-2- Préparation des extraits d'algues marines.....	13
III-1-3- Entretien des animaux.....	14
III-1-4- Traitement des animaux.....	14
III-2- Méthodes :.....	15
III-2-1- Prélèvement du sang.....	15
III-2-2- Comptage des éléments figurés du sang.....	15
III-2-3- Paramètres érythrocytaires.....	17
III-2-4- Détermination de la formule leucocytaire.....	18
III-2-5- Evaluation de la tolérance locale des extraits d'algues marines.....	18

IV- RESULTATS:	19
IV-1- Variations hématologiques au cours de la phase aiguë.....	19
IV-1-1- Résultats de la numération globulaire.....	19
IV-2- Résultats de l'étude de la toxicité sub-aiguë.....	20
IV-2-1- Résultats de la numération globulaire.....	20
IV-2-2- Résultats de la tolérance cutanée.....	22
V- DISCUSSION:	24
VI- CONCLUSION:	26
ANNEXE	27
BIBLIOGRAPHIE	29

INTRODUCTION

I-INTRODUCTION

L'emploi des algues marines en médecine est beaucoup plus ancien que leurs usages alimentaires et le nombre de variétés utilisées est beaucoup plus restreint. Mais l'intérêt croissant qu'elles suscitent depuis quelques années dans le monde scientifique commence à apporter ses fruits par la mise sur le marché des premières substances d'origine marine. On s'attend à de nouvelles découvertes qui viendront enrichir notre arsenal thérapeutique.

Longtemps employées par la médecine traditionnelle chinoise (dés 2700 ans avant J.C), les algues ont souvent été prescrites dans les régions côtières pour remédier à certaines affections rhumatismales, pulmonaires ou thyroïdiennes.

De nos jours les extraits d'algues marines, substances d'origines végétales, sont largement étudiés dans le domaine médical où on leurs reconnaît plusieurs activités pharmacologiques: anticoagulante, antibactérienne, anti-tumorale, antivirale.

Il faut avoir conscience que , comme tout effet se produisant; l'effet indésirable est le résultat de telle ou telle partie d'algues marines, soit au niveau des organes internes comme le tissu sanguin, modifiant profondément ces métabolismes, soit au niveau de la peau et des muqueuses provoquant des dermites plus au moins graves.

Notre étude contribue à rechercher d'autres substances de toxicité moindre. A cet effet, nous avons extrait les principes actifs d'algues marines de la côte de Jijel reconnues pour leurs effets thérapeutiques et nous essayons de mettre en évidence leurs effets indésirables potentiels sur le sang et le derme.

Pour cela, nous avons effectué une étude aiguë et sub-aiguë sur des rats wistar albinos.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

II- ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

II-1-Rappel général d'hématologie

Le sang est un liquide circulant dans les artères et les veines de l'organisme. Il n'est pas simplement un liquide, sa viscosité notable est due à la présence de millions de cellules dont les activités en font un tissu du corps. Il est constitué d'un liquide incolore, le plasma qui est composé d'eau, de sel minéraux et de molécules organiques (glucides, lipides et protides). (Bernard ,1990).

Le sang apporte aux tissus l'oxygène en extrayant le gaz carbonique et les substances absorbées par le tube gastro-intestinal. Il participe à la régulation de la température du corps et distribue les hormones, les médicaments et d'autres agents régulateurs des fonctions cellulaires.

II-1-1- L'hématopoïèse

L'hématopoïèse représente la production des éléments figurés du sang essentiellement par la moelle osseuse. Chez le fœtus, les cellules sanguines sont également formées dans le foie et la rate. Cet hématopoïèse extra médullaire peut exister chez l'adulte au cours des affections où la moelle est détruite ou devenue fibreuse. Chez l'enfant les cellules sanguines sont produites dans la cavité médullaire de tous les os (moelle osseuse rouge active).

Toutes les espèces des cellules sanguines dérivent d'une seule cellule souche mésenchymateuse grosse à noyau volumineux avec un réseau de chromatine à large mailles et à 3ou 4 nucléoles. (Boussenane et Slimani, 2001)

II-1-2- Les éléments figurés du sang

II-1-2-1- Les globules rouges

Les érythrocytes ou hématies transportent de l'hémoglobine dans la circulation .Ce sont des disques biconcaves fabriqués dans la moelle osseuse, chez les mammifères, ils perdent leur noyau avant d'entrer dans la circulation .

Leur durée de vie est d'environ 120 jours, puis ils sont détruits dans la rate. Le nombre normal chez l'homme est de 4,5 à 6,5 millions/mm³, chez la femme est de 4 à 5,5 millions/mm³ (Hamladji, 1988).

- L'hémoglobine

L'hémoglobine est une chromo-proteine, contenu dans les globules rouges et assurant le transport de l'oxygène et du gaz carbonique. (Domart et Boureuf, 1989).

Généralement cette chromo-proteine est ingérée dans les hématies à raison d'environ 280 millions de molécules/ hématies. (Louisot , 1983).

Le taux d'hémoglobine normal est de 12 à 16g/100ml chez la femme, et de 14 à 18g/100ml chez l'homme (Hamladji, 1988).

II-1-2-2-Les globules blancs

Ou leucocytes sont très différents des rouges, ils sont gros et ne sont pas tous identiques (Marshall, 1995).

Le chiffre normal des leucocytes est compris entre 4000 et 10000 /mm³, ils sont de deux types:

-Les leucocytes granulaires aux noyaux ronds, appelées également polynucléaires comprennent: les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.

-Les leucocytes non granulaire aux noyaux ronds sont: les lymphocytes et les monocytes.

II-1-2-3- Les plaquettes

Les plaquettes sont des fragments cytoplasmiques anucléés qui survivent dans la circulation pendant dix jours environ, il y en a entre 200000 et 400000/ mm³ de sang circulant Ces derniers sont des cellules de la moelle osseuse de grande taille et de haute ploïdie. Il font une lignée cellulaire unique et facilement reconnaissable en microscopie.

La production des plaquettes est régulée par une substance circulante appelée la thrombopoïétine qui accroît la production de mégacaryocytes et stimule leurs développements.(Dreyfus, 1992).

Tableau I L'Hémogramme chez l'adulte normal.

	HOMME	FEMME
Hématies (millions/mm ³)	4.5 à 6.2	4 à 5.4
Hémoglobine (g/100ml)	13 à 18	12 à 16
Hématocrite %	40 à 50 %	35 à 47%
VGM μ^3 (volume globulaire moyen)	Entre 85 et 95 μ^3	
CCMH % (concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine)	Entre 32 et 36%	
Globules blancs (mm ³)	4000 à 10000	
Polynucléaire neutrophiles (mm ³)	1700 à 7000 (40 à 70%)	
Polynucléaire éosinophiles (mm ³)	50 à 500 (1 à 3%)	
Polynucléaire basophiles (mm ³)	10 à 50 (0 à 0.5 %)	
Lymphocytes (mm ³)	1500 à 4000 (20 à 40%)	
Monocytes (mm ³)	100 à 1000 (3 à 10%)	
Plaquettes (mm ³)	200000 à 400000	
Réticulocytes (mm ³)	Entre 25000 et 100000	

II-2- Substances à action toxique sur le sang

II-2-1- Les médicaments

La plupart des médicaments ont des effets secondaires parfois dangereux. Mais les troubles qu'ils provoquent sont davantage liés à une prescription médicale intempestive ou à une utilisation désordonnée qu'à leur toxicité.

Généralement tous les médicaments à base d'acide acétylsalicylique (les antalgiques) provoquent des syndromes hémorragiques avec augmentation du temps de saignement, cette action persiste plus d'une semaine après l'arrêt du traitement. La pénicilline provoque des cas d'anémie, de thrombopénie et de leucopénie lors de l'administration par voie veineuse (Halleb et Kadja, 1999).

II-2-2- Les métaux lourds et autres substances

L'action du plomb, une fois dans l'organisme provoque des modifications importantes:

- Au niveau de la moelle osseuse. Inhibition de l'hème de l'hémoglobine dans l'érythroblaste.
- Ce métal agit également sur le globule rouge provoquant une anémie hémorragique en inhibant le groupement SH. Ainsi qu'en déformant le globule rouge ce qui provoque la formation d'anticorps anti-globule rouge.

Des troubles de la coagulation (hyper-coagulabilité, fibrinolyse) sont parfois observés lors d'intoxications aiguës par certains pesticides organophosphorés. (Holmes et collaborateurs, 1974).

Les substances organiques comme l'action myélotoxique du benzène peut se manifester sous forme de leucémie ou d'érythroleucémie.

Plusieurs cas d'anémie aplasique attribué à une exposition au lindane (insecticide) ont été signalés. (Friberg et collaborateurs, 1967).

L'arsenic inorganique peut induire des leucémies. (Léonard et Lauwerys, 1980)

Ces données montrent l'influence des substances sur le sang y compris des médicaments ayant obtenus l'autorisation de mise sur le marché (AMM) et permet de montrer l'importance de notre étude sur les extraits d'algues.

II-3- Rappel de toxicologie cutanée

II-3-1- Les substances à action toxique sur la peau et la muqueuse

Toute substance toxique peut exercer un effet local(irritation, nécrose, eczéma,...) ou général. L'introduction dans la peau de particules étrangères, à la suite d'un traumatisme ou de projection répétés, ne peut entraîner aucun inconvénient ou être la source de complication, selon la nature du matériel introduit (particule de charbon, fer, huiles de graissage, amiante) (Lachapelle, 1984).

Les irritants sont des substances qui, appliquées sur la peau dans certaines conditions engendrent chez la plupart des sujets, une lésion dermo-épidermique, dont l'importance dépendra de la nature du produit, de sa concentration et du temps d'application. (Chabeau et Ducomb, 1979).

Certains médicaments bien tolérés par voie générale sont particulièrement sensibilisant par voie cutanée, les antihistaminiques par exemple. De nombreux topiques cutanés, délivrés sans ordonnance (essences végétales par exemple) peuvent entraîner des eczéma, de même,

que l'usage abusif ou prolongé des pommades, crèmes ou autres, est susceptible d'induire une sensibilité. Une négligence des précautions d'emplois (dilution non respecter, exposition solaire) peut être la source de dermatites par irritation ou par sensibilisation (Halleb et Kadja, 1999).

II-3-2- Les modifications physiopathologiques du derme

II-3-2-1- Les lésions cutanées

Sont soit primaires, soit secondaires à des lésions primaires:

La lésion élémentaire est théoriquement la lésion primitive non modifiée de la dermatose telle qu'elle apparaît à l'observateur. Cette lésion peut être nette, permanente mais peut être moins évidente par le regard, la palpation. Il faut en distinguer les lésions dites secondes, apparaissant par transformation spontanée ou provoquée de la lésion primaire prurigineuse. Ce sont des excoriations habituellement linéaires, parfois profondes, ulcérés, quelque fois réduite à un pointillé hémorragique. Les ongles sont usés, lisses en cas de prurit qui s'observe au cours des eczémas et particulièrement de la dermatite atopique. (Touraine et Revuz, 1981).

II-3-2-2- Eczémas

L'eczéma se définit comme une inflammation superficielle de la peau accompagnée de prurit et caractérisé par une éruption polymorphe formée d'érythème, de vésicules, de croûtes. Ces diverses lésions se succèdent en 04 phases, qui sont surtout nettes dans l'eczéma aigu par allergie de contact: la phase d'érythème prurigineux, plus au moins oedémateux; la phase de vésiculation rapidement suivie par la phase de suitement, due à la rupture des vésicules, spontanément ou par le grattage, puis la phase de régression où les croûtes formées par l'élimination de l'épiderme altéré se détachent progressivement.

Sous le terme d'eczéma on décrit plusieurs syndromes différents dans leur expression clinique, dans leurs mécanismes tandis que le stigmate histologique reste le même et l'on distingue ainsi:

- les eczémas de contact.
- les eczémas par photosensibilisation.
- les eczémas par réactogènes internes.

Ces trois formes peuvent être d'origine médicamenteuse (naturels ou de synthèses). D'autres formes sont également signalés:

- les eczémas microbiens et mycosiques.
- l'eczéma atopique ou dermatite atopique.
- l'eczéma séborrhéique ou dermatite séborrhéique.

(Bousquet et collaborateurs, 1993).

II-4- Les algues marines

II-4-1- Les algues, sources de médicaments

L'utilisation des algues marines à des fins thérapeutiques est loin d'être un phénomène nouveau. Aujourd'hui, les principes actifs extraits d'algues sont assez peu nombreux en pharmacie, mais la recherche explore cette fantastique source de molécules, car l'usage des algues en tant que principe actif est plus restreint.

Les extraits d'algues marines sont préconisés en de nombreuses spécialités pharmaceutiques, intègrent dans leurs formulations des colloïdes algaux comme excipients (sirop, enrobage des pilules et dragées). Dès lors, il existe des médicaments contenant des algues marines ou des principes actifs qui en sont issus, utilisés dans la lutte contre l'embonpoint (prise de poids) et dans le cas de la constipation (effet laxatif) (Brault, 1998).

II-4-2- Classification

Les algues constituent une division particulièrement hétérogène représentée par des organismes dont les caractéristiques sont extrêmement variables. Pour cela elles sont regroupées en classes différentes sur la base de la nature de leurs pigments, de leurs substances de réserves. Les algues (sans tenir compte des protophytes) se divisent en:

II-4-2-1- Algues vertes (Chlorophycées)

Elles vivent surtout dans les milieux aquatiques, essentiellement dans les milieux d'eau douce, même si certaines formes sont marines. Elles sont dotées d'un thalle filamenteux, en lame ou tridimensionnel. Elles semblent être à l'origine des plantes supérieures car elles sont dotées des mêmes molécules de chlorophylle, d'amidon. Exemple d'algue verte: *Spirogyra*.

II-4-2-2- Algues brunes (Phéophycées)

La plupart d'entre elles vivent dans les mers froides des régions tempérées, présentent un thalle filamenteux, en forme de bande, parfois même plus complexe, leur nom est dû au fait qu'elles contiennent un pigment fucoscanthine, un pigment qui cache le vert de la chlorophylle rendant ces algues marron. L'une des plus connues est le *Sargassum*.

II-4-2-3- Algues rouges (Rhodophycées)

Il s'agit pour l'essentiel d'algues marines qui vivent fixées sur des roches ou sur d'autres algues. Dotées d'un thalle filamenteux, elles sont abondantes dans les régions tropicales. Elles évoluent à une profondeur plus grande que celle des autres groupes car elles possèdent des pigments particuliers capables d'absorber les radiations lumineuses accédant aux eaux profondes, ce sont les phycobilines, de couleurs rouges, qui, avec d'autres pigments cachent la couleur verte de la chlorophylle et font prendre aux algues des couleurs différentes. Exemple: *Laminaria saccharina*.

II-4-3-Intérêt thérapeutique et autres

Dans l'état actuel de nos connaissances, on peut déjà retenir parmi les algues marines utilisées aujourd'hui dans le domaine thérapeutique:

- La plupart agissent comme des stimulants du métabolisme général en intervenant au niveau de certaines glandes endocrines, en accroissant les échanges osmotiques, et en favorisant l'élimination des déchets.
- De nombreuses algues marines possèdent des propriétés plus spécifiques, notamment: hypocholestérolémiantes, hypoglycémiantes, hypotensives, anticoagulantes, muco-protectrices digestives laxatives. Certaines ont encore des actions cardiotoniques, antibactériennes, antifongiques, antivirales.

Quoique l'utilisation thérapeutique des bains d'algues marines permet d'obtenir de très bons résultats dans de nombreuses indications médicales et cosmétologiques conduisant à une excellente possibilité naturelle de relaxation, de désintoxication, parfois même un traitement à part entière dans de nombreux états et troubles malades.

Dans le domaine cosmétologique les excellents résultats obtenus du fait de leurs actions sont:

- Stimulante de la circulation sanguine locale qui entraîne une grande vitalité de la peau.
- Tonifiante des tissus cutanés qui provoquent leurs raffermissements.
- Désintoxicantes qui, en favorisant l'élimination des déchets par les glandes sudoripares et sébacées.(Donadiou, 2000).

II-4-4-Les risques des algues marines

Il faut savoir que la prise par voie générale, digestive de certaine espèce d'algues marines riches en iode, sous forme de médicament, en quantité ou en durée, impose une certaine prudence chez les rares personnes intolérantes à ce corps, est susceptible d'induire, dans ces cas une hyperthyroïdie. Dans ce cas ,il faut un avis et une surveillance médicale attentive(Donadiou, 2000) .

De nos jours, il existe une algue tueuse *Caulerpa taxifolia* qui prolifère en méditerranée, dans des eaux polluées ou propres, provoquant des ravages, à commencer par son expansion tout au long des côtes Européennes, qui détruit et appauvrit de façon irréversible la biodiversité sous-marine, et constitue un risque majeur pour l'environnement. L'espoir réside actuellement dans la lutte biologique mené grâce à la limace des caraïbes *Elysa subomata* (prédateur de *Caulerpa taxifolia*). (Jérôme, 1999)

MATERIEL ET METHODES

III- MATERIEL ET METHODES

III-1- Matériel

III-1-1- les différents types d'algues marines

La récolte des algues marines a été réalisée au large de la côte de Jijel dont les espèces sont les suivantes: *Ulva lactuca*, *Ascophyllum nodosum*, *Chondrus crispus*, *Sargassum nuticum*, *Codium bursa*, *Dictyota dichotoma*, *Rissoella verruculosa*, *Cystoseina mediterranea*, *Posidonia oceanica*, *Padina pavonica*.



Photo 1. Ulva lactuca (algue verte)



Photo 2. Ascophyllum nodosum (algue brune)



Photo 3. Chondrus crispus (algue rouge)



Photo 4. Sargassum nuticum (algue brune)



Photo 5. Codium bursa (algue brune)



Photo 6. Dictyota dichotoma (algue brune)



Photo 7. Rissoella verruculosa (algue brune)



Photo 8. Cystoseira méditerranæe (algue rouge)





Photo 9. *Posidonia oceanica* (algue verte)



Photo 10. *Padina pavonica* (algue brune)

III-1-2- Préparation des extraits d'algues marines

Trois espèces d'algues ont été utilisées: algue verte (*Ulva lactuca*), rouge (*Chondrus crispus*) et brune (*Ascophyllum nodosum*), après lavage, une récolte d'algues est laissée fraîche, l'autre moitié est mise au séchage dans une étuve à 55°C pendant 48 heures dans le but de la déshydrater.

Les deux récoltes d'algues sont réduites en éléments de petite taille (en poudre), ensuite les algues sont soumises à des extractions successives avec 4 types de solvants: benzène, méthanol, éthanol et chloroforme dans un rapport 1/10 (20g d'algues pour 200ml de solvant).

Après 72 heures on filtre les solutions obtenues, puis on les évapore dans l'étuve pendant 24 heures à 50°C. Les résidus ainsi obtenus sont repris avec de l'eau distillée (1g de résidus pour 5ml d'eau distillée).

Enfin, les extraits d'algues fraîches et sèches de chaque espèce sont mélangées pour en obtenir qu'un, sans toucher aux solvants.

Remarques

- Etant donné que les algues sèches ne perdent que 5% de la totalité de leurs constituants, nous avons jugé utile de faire le mélange des extraits d'algues fraîches et sèches.
- Pour notre étude nous avons choisis l'extrait au benzène, car les extraits d'algues obtenus avec du benzène présentent de meilleurs résultats. (selon les données bibliographiques).
- L'étude est complétée par l'évaluation de l'influence de l'extrait d'algues brunes (extrait dans l'éthanol) sur le sang et la peau. Les autres extraits restants sont conservés pour des études à venir.

III-1-3- Entretien des animaux

Notre étude a été réalisée sur des rats "wistar" albinos élevage institut Pasteur, Alger, pesant 230g environ, mis au préalable en quarantaine (7 jours avant leur utilisation).

Les animaux sont élevés dans des cages en plastique ayant libre accès à l'eau et à la nourriture (croquettes UAR). La température ambiante avoisine les 25°C.

III-1-4- Traitement des animaux

Six lots d'animaux (3 rats par lot) ont été utilisés pour l'étude:

- a- les animaux du premier lot reçoivent une dose unique de 1.5ml d'eau distillée par voie orale, et servent de témoin.
- b- le deuxième lot d'animaux est traité par l'extrait d'algue verte (extrait dans le benzène) à la dose unique de 1.5ml, par voie orale.
- c- le troisième lot d'animaux traité à l'extrait d'algue rouge (extrait dans le benzène) à la dose unique de 1.5ml, par voie orale.
- d- le quatrième lot d'animaux traité à l'extrait d'algue brune (extrait dans le benzène) à la dose unique de 1.5ml, par voie orale.

e- le cinquième lot d'animaux reçoit une dose unique de 1.5ml d'algue brune (extrait dans l'éthanol), par voie orale.

f- le sixième lot d'animaux subit un traitement cutané.

III-2- Méthodes

III-2-1- Prélèvement du sang

1ml de sang est prélevé chaque 3j et 7j après l'administration des extraits d'algues à l'aide d'un tube capillaire au niveau de l'œil (sinus recto-orbital). On laisse couler le sang dans un tube préparé spécialement et contenant 0,1ml de l'EDTA 8,5%: Ethylène Diamine Tétra Acétique de sodium (anticoagulant).

III-2-2- Comptage des éléments figurés du sang

La numération des éléments figurés du sang consiste à déterminer le nombre des cellules dans un certain volume de sang (Belhani, 1989).

Les numérations sont réalisées par deux méthodes: manuelle et automatique.

III-2-2-1- La méthode manuelle

Cette méthode implique une dilution dans un liquide qui conserve les cellules que l'on veut compter, le comptage est effectué dans la cellule de Thoma.

a-Numération érythrocytaire (globules rouges).

Dans un tube à essai, nous avons réalisé une dilution au 1/200 ; à l'aide d'une micro pipette on aspire 1ml du liquide de marcano (cf. Annexe), ensuite 5 µl du même liquide sont rejetés, et remplacés avec 5µl du sang prélevé sur anticoagulant.

A l'aide de la pipette et avec précaution, une petite goutte de la suspension érythrocytaire est déposée au bord de la lamelle. La goutte se répand ensuite à l'intérieur de la cellule.

La cellule est placée sous l'objectif microscopique et on attend deux minutes avant de commencer la numération pour laisser les hématies se déposer.

Pour la numération, les globules rouges sont dénombrés dans cinq rectangle; soit N le nombre total d'hématies donc: $N \times 10000$ hématies par mm^3 de sang.

b- Numération leucocytaire (globules blancs).

Dans un tube à essai, une dilution au 1/10 est effectuée ; On prend 200 μl de la solution de lazarus (cf. Annexe). Après avoir rejeté 20 μl du même liquide, on ajoute 20 μl du sang non coagulé.

Le sang est mélangé avec le liquide et après avoir laissé 5 minutes pour la destruction des globules rouges, on remet les globules blancs en suspension en éliminant ainsi les premières gouttes du mélange. Après la mise au point, les globules blancs sont comptés, à l'objectif 40. Le nombre total de globules blancs est de: $N \times 100$

c- Numération des plaquettes

Elle est identique à celle des leucocytes, pour une dilution 1/100. Dans un tube à essai, préférablement en verre, à l'aide d'une micro pipette, on aspire 1000 μl de procaine (cf. Annexe), 10 μl du même liquide sont rejetés et on les remplace avec 10 μl du sang non coagulé, puis on mélange le tout.

Le tube est agité au moins une minute, et laissé au repos pendant 30 minutes. Il est agitée une nouvelle fois pendant 30 secondes et on observe à l'objectif 40. La numération est effectuée en comptant toutes les plaquettes se trouvant dans la chambre. Le nombre total de plaquettes est de: $N \times 1000$

III-2-2-2- La méthode automatique (au Coulter).

La méthode du coulter, compte et mesure exactement les cellules par la détection et la mesure des changement dans la résistance électrique.

Une suspension des cellules sanguines passe à travers un micro-orifice simultanément avec un courant électrique, chaque cellule passant à travers le micro-orifice provoque un changement d'impédance, traduit par une brusque variation de potentiel.

Les impulsions, correspondantes à chaque passage fournissent deux informations:

- le nombre d'impulsions au cours de l'analyse d'un volume de sang constant.
- l'amplitude de l'impulsion est proportionnelle au volume de la cellule comptée.

Ainsi, le sang est dilué au 1/200 dans le liquide de marcano pour le comptage de globules rouges dans un godet soigneusement rincé. Le sang est aspiré automatiquement puis analysé. Selon le type de coulter, plusieurs paramètres sont donnés, nombre de GB, plaquettes, VGM, Hb.....

III-2-3- Paramètres érythrocytaires

III-2-3-1- Hémoglobine

La mesure de l'hémoglobine exprimé en g/100ml se fait au spectrophotomètre selon la technique suivante:

On prélève 20ul de sang veineux et 5ml de la solution de DRABKIN (réactif pour hémoglobine). on mélange soigneusement et on attend 3 à 5 minutes pour l'hémolyse totale. La densité optique est lue à 540nm puis reportée à la courbe d'étalonnage. L'hémoglobine peut être calculée automatiquement par un appareil de type coulter.

III-2-3-2- Hématocrite

L'hématocrite est le pourcentage occupé par les globules rouges dans un volume de sang donné rendu incoagulable, c'est le rapport du volume globulaire total par rapport au volume de sang total.

L'hématocrite peut être calculé à partir du volume globulaire moyen et du nombre d'hématies en μl . Il est calculé le plus souvent automatiquement par les appareils de type coulter, les résultats obtenus sont dans ce cas légèrement inférieur à ceux donnés par la micro-hématocrite mais l'étalonnage de l'appareil permet éventuellement d'obtenir des résultats identiques.(Frejaville et Kamoun, 1981).

III-2-3-3- Le volume globulaire moyen (VGM)

Le volume globulaire moyen est une constante érythrocytaire, indispensable à la classification des anémies, il peut être mesuré directement par le compteur électrique ou calculé après utilisation de méthodes manuelles. Il est donné par la formule suivante:

$$VGM = \frac{\text{Hématocrite}}{\text{Nombre d'hématies } (10^6 / \text{mm}^3)} * 10$$

III-2-4- Détermination de la formule leucocytaire

La formule leucocytaire n'a été déterminée que par la méthode automatisée. Nous n'avons pas effectué de frottis sanguins. Ainsi le coulter donne, le nombre de granulocytes et de lymphocytes et les pourcentages correspondants.

III-2-5- Evaluation de la tolérance locale des extraits d'algues

L'étude de la tolérance cutanée a été réalisée sur le sixième lot d'animaux, qui ont subi une évaluation aiguë et sub-aiguë.

Le dos des rats est rasé et divisé en 4 parties identiques. Après, on dépose chaque jour et dans chaque carré une goutte des différents extraits d'algues marines. Parallèlement, l'étude de la tolérance sur les muqueuses est réalisé par l'instillation quotidienne dans le cul de sac l'œil gauche (celui du droit sert de témoin) et dans le nez, d'une goutte de l'extrait. L'observation des animaux (rougeurs, prurits, ulcérations, œdèmes...) commence immédiatement après le dépôt des extraits et se poursuit jusqu'au 7^{ème} jour.

RESULTATS

IV- RESULTATS

Les résultats de notre étude comprennent les variations hématologiques secondaires aux traitements par des extraits d'algues à court terme (toxicité aiguë) et à long terme (toxicité sub-aiguë) ainsi que la tolérance et de la peau et des muqueuses aux mêmes substances d'origine algale.

IV-1- Variations hématologiques au cours de la phase aiguë

IV-1-1- Résultats de la numération globulaire

Le comptage des éléments figurés du sang effectué 3 et 7 jours après l'administration quotidienne de 1,5 ml d'extrait d'algue a permis de donner les résultats rassemblés dans les tableaux suivants :

Tableau II : nombre absolu des éléments figurés du sang 3 jours après l'administration des différents extraits d'algues marines.

Solvant	----- <i>Lot témoin</i>	Benzène			Ethanol
		<i>Lot traité Algue verte</i>	<i>Lot traité Algue rouge</i>	<i>lot traité Algue brune</i>	<i>Lot traité Algue brune</i>
<i>Globules rouges (10⁶/mm³)</i>	5,47±0,81	4.46 ± 0,34	4,28 ± 0,76	4,88± 0,25	4,78 ± 0,1
<i>Globules blancs (10³/mm³)</i>	4,83±0,37	4,23 ± 0,57	4,33 ± 0,47	4,53 ± 1,27	4,16 ± 1,04
<i>Plaquettes (10³/mm³)</i>	776±74	589,33±137,67	725±164	695 ± 57	669,33±94,67

Le tableau montre une diminution remarquable dans les taux des globules rouges (baisse de 1 millions/mm³ par rapport au témoin) dans tous les lots et particulièrement dans celui traité aux extraits d'algue rouge..

Les taux de globules blancs et des plaquettes sont peu affectés par les traitements.

IV-2- Résultats de l'étude de la toxicité sub-aiguë

IV-2-1- Résultats de la numération globulaire

IV-2-1-1 - Lignée érythrocytaire

Tableau III :Variation des paramètres érythrocytaires en fonction du traitement par les extraits d'algues au délai de 7 jours.

Solvant	-----	Benzène			Ethanol
		Lot témoin	Lot traité Algue verte	Lot traité Algue rouge	Lot traité Algue brune
Globules rouges (10 ⁶ /mm ³)	5,47 ± 0,81	3,7 ± 0,18	3,85 ± 0,72	3,43 ± 0,56	3,63 ± 0,09
Hémoglobine(Hb) (g/100ml)	16 ± 0,3	12,75 ± 0,75	11,25 ± 1,25	11,70 ± 0,8	11,6 ± 0,1
Hématocrite(Ht) (%)	39,65±1,55	26,40 ± 2	26,45 ± 4,65	24,75 ± 4,05	26, 05 ± 0,75
VGM (μ ³)	72,48±0,85	71,15 ± 4,5	68,75 ± 0,60	72,1	71,8 ± 0,2
CCMH (g/100ml)	40,4 ± 2,35	48,8 ± 4,5	43,05 ± 2,85	48,05 ± 4,65	44,6 ± 0,9
TCMH (pg)	29,25±0,05	34,55 ± 3,65	29,6 ± 2,2	34,65 ± 3,35	32 ± 0,5

Le tableau montre une diminution significative du nombre de globules rouges. Elle atteint 40% dans le lot d'animaux traités par les extraits d'algues brunes. Tous les paramètres se trouvent affectés. On note une baisse de l'hémoglobine, hématocrite et du VGM et une augmentation de la CCMH et TCMH. Ce qui traduit l'induction d'anémies microcytaires hyper chromes.

IV-2-1-3- Lignée leucocytaire:

L'effet des extraits d'algues marines sur la lignée blanche est objectivé par les résultats suivants :

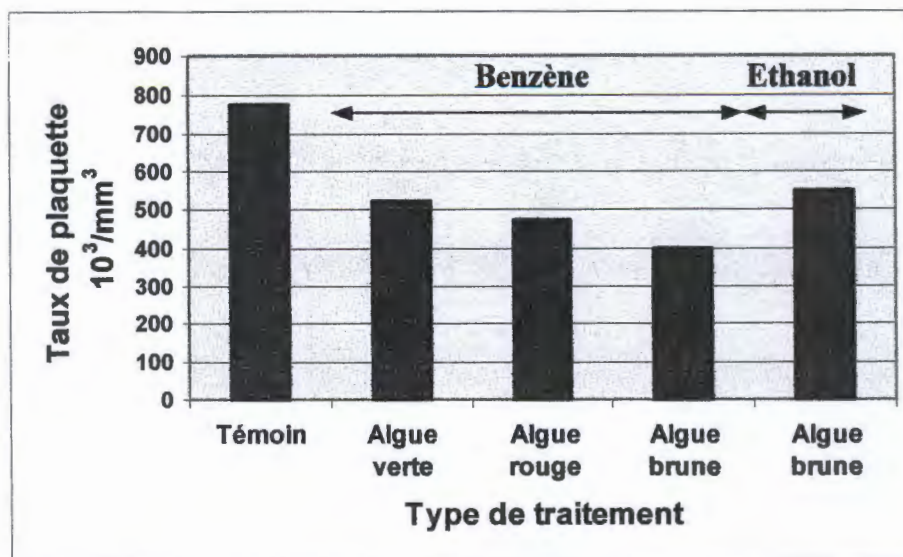
Tableau V :Nombre absolu de globules blancs après traitement par les extraits d'algues marines au délai 7 jours.

Solvant	----- Lot témoin	Benzène			Ethanol
		Lot traité Algue verte	Lot traité Algue rouge	lot traité Algue brune	Lot traité Algue brune
Globule blanc (10 ³ /mm ³)	4,83 ± 0,37	3,9 ± 0,7	4,65 ± 0,7	4,65 ± 0,45	4,35 ± 0,4
Lymphocytes (10 ³ /mm ³)	3,4 ± 0,65	2,09 ± 0,6	2,05 ± 1,35	2,35 ± 1,25	2,05 ± 0,95
Granulocytes (10 ³ /mm ³)	2,2 ± 0,05	3 ± 0,1	3,95 ± 1,75	2,35 ± 1,65	2,35 ± 0,15
Lymphocytes (%)	60,8 ± 1	36,4 ± 11,6	35,7 ± 25,1	51,95 ± 30	43,85 ± 13,75
Granulocytes (%)	39,2 ± 1	63,6 ± 11,6	64,13 ± 22,1	48,05 ± 30,85	56,15 ± 13,75

Sous l'effet des différents extraits mis à l'étude, les taux de globules blancs est peu modifié hormis chez les animaux traités à l'algue verte. La formule leucocytaire montre une augmentation des granulocytes et une diminution des lymphocytes. En effet, la formule se trouve inversée sauf dans le cas du traitement aux algues brunes.

IV-2-1-2- Lignée plaquettaire

L'influence des extraits d'algues sur les thrombocytes est représentée par le graphe ci-après :



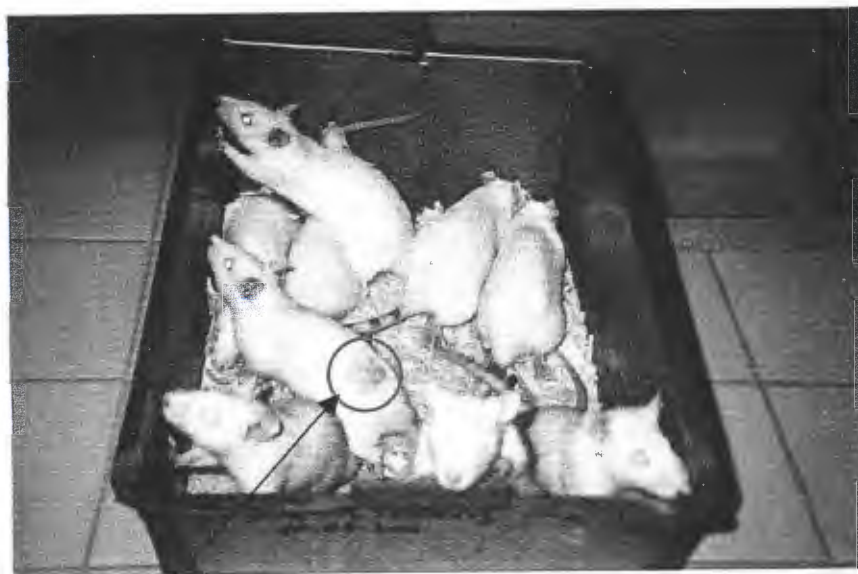
Graphe I : Variation du nombre absolu de plaquette après traitement par les extraits d'algues marines au délai de 7 jours

Les valeurs des plaquettes suivent des modifications dans les différents lots d'animaux traités par rapport à celle du témoin. La diminution la plus significative est observée dans le lot traité à l'algue brune ou elle atteint 48,5% (776 contre $400 \cdot 10^3/mm^3$).

IV-2-2- Résultats de la tolérance cutanée

L'application des différents extraits bruts d'algues marines sur la peau des rats préalablement rasés n'a montré aucune lésion cutanée de nature tuméfiée, enflammée ou autres depuis le début du traitement (3jours et 7jours), ce qui nous laisse penser à une bonne tolérance cutanée chez les rats.(photo.11).

Parallèlement, les muqueuses ophtalmiques et nasales ne montrent aucun signe d'intolérance aux différents types d'extraits d'algues marines.



Aucune lésion cutanée de nature tuméfiée,
enflammée ou autre

Photo 11. Résultats de la tolérance cutanée sur la peau des rats

DISCUSSION

VI- DISCUSSION

Toute substance, s'infiltrant dans l'organisme sera véhiculée par le sang, ce qui rend ce dernier le tissu le plus exposé à l'action de ces substances toxiques. Même si beaucoup considèrent que les substances cosmétiques sont peu toxiques, la réglementation internationale (FDA, OMS) exige la vérification de leur innocuité avant leur mise sur le marché. Elle consiste à vérifier en particulier la tolérance cutanée et muqueuse pour les produits cosmétiques d'applications locales et à vérifier en plus l'effet sur le sang pour les substances injectés ou susceptibles d'atteindre la circulation sanguine. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude sur les algues marines de la côte Jijelienne.

En effet, même si sur le plan pharmaceutique les algues n'ont que très peu d'application pour le moment. (Lahouel,2001),ils constituent une très bonne matière en cosmétologie.

Plusieurs espèces d'algues vertes, rouges et brunes ont été récoltées de la région de Jijel (une côte non polluée et riche en espèces). Après identification, elles ont été soumises aux extractions de leur principes actifs par différents solvants (benzène, éthanol....).

Notre étude s'inscrit alors dans la première étape de l'étude d'une nouvelle substance pharmaceutique (l'étape de premier tri ou screening). Il existe des substances d'origine végétale toxique sur le sang et la peau, comme celles des alcaloïdes de la Pervenche. En effet, la vinblastine, vincristine et vindésine ont une toxicité hématologique sévère.(Lahouel, 1999).

Les contrôles sanguins effectués pendant la phase aiguë (72 heures) et la phase sub-aiguë (7 jours) et après administration par voie orale des différents extraits d'algues marines avec des doses de 1,5 ml /rat en administration unique, ont fait apparaître les modifications suivantes:

La lignée plaquettaire a subi une diminution modérée témoignant d'une thrombopénie, de même que le taux des globules blancs qui ont également diminué après l'administration des extraits d'algues marines, ce qui explique une leucopénie, peu sévère accompagné d'une diminution des lymphocytes(lymphopénie).

La lignée érythrocytaire est caractérisée par une diminution significative du nombre absolu des hématies (anémie) et une baisse du volume globulaire et une augmentation de la CCMH: c'est une anémie de type microcytaire hyperchrome.

Sur le plan dermatologique, et après les tests effectués sur les rats en phase aiguë et sub-aiguë au niveau du dos, du nez et des yeux, nous n'avons constaté aucune éruption

cutanée ou rougeur au niveau des points d'application ,ce qui est en faveur d'une bonne tolérance de la peau aux extraits d'algues marines.

CONCLUSION

V- CONCLUSION

Notre étude réalisée sur l'évaluation de la tolérance cutanée et hématologique des extraits d'algues marines de la région de Jijel a montré:

- Que les extraits d'algues marines sont bien tolérés localement puisque nous n'avons observé aucune anomalie des parties cutanées sur lesquelles nos produits ont été appliqués.
- Cependant, les extraits possèdent une influence assez profonde sur le tissu sanguin.

En effet, d'importantes perturbations dans les taux des trois lignées ont été enregistrées. Ses modifications s'observent entre le 3^{ème} jour et le 7^{ème} jour suivant l'administration des solutions (extraits d'algues).

- L'utilisation des algues marines doit être employée avec prudence par voie générale.

ANNEXES

Annexes

1- PREPARATION DES REACTIFS

-LAZARUS (réactif qui lyse les hématies (GR), les plaquettes, et préserve les leucocytes (GB) intacts)

- | | |
|---------------------|----------------|
| - Acide-acétique | 5 ml. |
| - Bleu de méthylène | 2 à 3 gouttes. |
| - Eau distillée | 100 ml. |

-LE MARCANO (réactif qui lyse les leucocytes (GB), les plaquettes, et préserve les hématies (GR) Intactes)

- | | |
|---|----------|
| - Sulfate de Na ⁺ (Na ₂ SO ₄) | 5g. |
| - Formol commercial (CHCHO) | 1 ml. |
| - Bleu de méthylène | 0.01 ml. |
| - Eau distillée | 100 ml. |

-CHLORHYDRATE DE PROCAINE (réactif qui lyse les leucocytes (GB), les hématies (GR), et préserve les plaquettes Intactes).

- | | |
|-----------------|----------|
| - Procaïne | 2.43g. |
| - Nacl | 0.2g. |
| Ou Nacl à 9 ‰ | 22.2 ml. |
| - Eau distillée | 100 ml. |

- L'Ethylène Diamine Tétracétique de sodium Anticoagulant: EDTA.

2- LES ABREVIATIONS

CCMH: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

VGM : Volume Globulaire Moyen.

TCMH: Taux Corpusculaire Moyen en Hémoglobine.

Hb: Hémoglobine.

Ht: Hématocrite.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché.

FDA: Food and Drug Administration

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Belhani. M, Dora. B, Belabas.S, Smaili.F, Bouzid. K:
Hématologie clinique. Edition OPU(Alger), 1989.
- 2- Bernard. J, Levy. J-P, Varet. B, Cachauvel, J-P, Rain.D, Sultan. V:
Abrégé en hématologie. Edition Masson(Paris), 1990.
- 3- Boussenane. H, Slimani W:
Effet préventif des flavonoides (DAFLAN 500) sur l'hématotoxicité d'un médicament anticancéreux (CYCLOPHOSPHAMIDE) chez le rat, mémoire de DES (C.U de Jijel), 2001
- 4- Bousquet. J, Godard. P et Bernard.F:
Allergie. Edition Ellipses (Paris), 1993.
- 5- Chabeau.G, Ducombs. G:
Dermato-allergologie de contact. Edition Masson (New York, Milan),1979.
- 6- Dominique Brault:
Site internet, 1998.
- 7- Dryfus. B, Janine. B, Félix. R, Henri. R, Jean. R:
Hématologie. Edition Flammarion (Paris), 1992.
- 8- Donadieu D:
Algues marines. Site internet/ htm, 2000.
- 9- Frejávill. J, Kamoun.P:
Guide des examens de laboratoire. Edition Flammarion médecine-science (Paris), 1981
- 10- Friberg. L, Martensson. J:
Case of pannyeloptisis after exposur to chlorophenothane and benzene hexaloride.
Arch, indut Health, 1967.
- 11- Halleb. M, Kadja. M:
Etude de la tolérance cutanée et hématologique d'un extrait brut de plante (Renonculus repens), mémoire de DES (U de Constantine), 1999.
- 12- Holmes. J, Starr. H, Hanish. R, Von Kaulla. K:
Short term toxicity of mevinphos in man. Arch environ, Health, 1974.
- 13- Lahouel. M :
Les limitations de la chimiothérapie anticancéreuse. Revue Saïdal,3, 1999.

14- Lahouel. M :

Recherche de substances bio-actives à partir de plantes médicinales terrestres et marines . 1^{er} séminaire national sur les plantes médicinales, Jijel 2001.

15- Léonard. A, Lauwerys.R:

Carcinogenicity tetratogenicity and mutagenicity of arsenic. Mut, Res ,1980.

16- Louisot. P:

Biochimie générale et médicale. Edition Villerbane (Paris),1983.

17- Marie Lachapelle. J:

Dermatologie professionnelle. Edition Masson(Paris, Milan), 1984.

18- Marshall. C:

Atlas du corps humain. Edition M.C Espagne, 1995.

19- Philippe Jérôme: site internet.

[http:// www.internatif.org/](http://www.internatif.org/),1999.

20- Domart. A, Bourneuf. J :

Nouveau Larousse médicale. librairie Larousse(France), 1989.

21- Rose-marie Hameladji:

Précis de sémiologie. Edition OPU(Alger), 1988.

22- Touraine.R, Revuz. J:

Dermatologie clinique et vénéréologie. Edition Masson(Paris), 1981.

Présenté par: BEGHOUL Ziad.

Date de soutenance: 30/09/2002

BOURFIS Toufik.

Titre:

Evaluation de la tolérance cutanée et hématologique des extraits d'algues marines

Nature du diplôme:

Diplôme d'Etudes Supérieures en Biochimie.

المخلص:

رغم التقدم المذهل الذي حققته الطحالب البحرية في الميدان الطبي على مدى العشرين سنة الماضية تبقى إستخداماتها كمكونات فعالة ضيقة جداً، كما أن الأنواع المستعملة منها قليلة لكن الإهتمام المتزايد الذي تثيره منذ سنوات في الأوساط العلمية لابد أن يقودنا عما قريب إلى إكتشافات جديدة ستعزز ترسنتنا العلاجية. تظهر الدراسة التي أجريناها على جردان "ويستار" أن تأثير مستخلصات الطحالب البحرية مقبول موضعياً، حيث أننا لم نلاحظ أي شذوذ على المناطق الجلدية موضع للعلاج، وعلى العكس تملك تأثيراً على النسيج الدموي رغم كونه ضعيفاً فإنها تمس خلايا الدم الثلاث.

The summary:

Despite the great progress achieved in the medical field during the last twenty years, the use of seaweeds as a therapeutic agent is still restricted and there are not a large number of species which are currently used. Nevertheless, scientists' interests have recently increased, and this will certainly result in new discoveries which may enrich our therapeutic arsenal.

The study, which we have carried out using "wistar" albino rats showed that these latter did not present with any abnormality at the cutaneous level when treated with seaweeds' extracts. However, this extract has an influence on the blood; it affects the three hematological lines.

Résumé:

Malgré les progrès les plus spectaculaires de ces 20 dernières années dans le domaine médical, l'usage des algues marines en tant que principe actif est beaucoup plus restreint, et que les espèces utilisées sont peu nombreuses. Mais l'intérêt croissant qu'elles suscitent depuis quelques années dans le monde scientifique débouchera certainement bientôt sur des nouvelles découvertes qui viendront enrichir notre arsenal thérapeutique.

Notre étude réalisée sur des rats Wistar albinos montre que les extraits d'algues marines sont bien tolérés localement, car aucune anomalie n'a été observée sur les parties cutanées traitées.

Par contre, les extraits d'algues marines possèdent une influence assez peu profonde sur le tissu sanguin. Ils touchent les trois lignées du sang.

Mots clés:

Hématologie - Toxicologie - Dermatologie - Extraits d'algues marines

Laboratoire de recherche:

Institut des sciences de la nature (C.U.de Jijel)

Responsable de recherche:

Dr. LAHOUEL Mesbah.