



Effet létal de l'extrait aqueux de l'algue brune marine (*Cystoseira tamariscifolia*) sur la souris et sur les cellules tumorales du myélome murin

**Zineb SOUHAILI^{1*}, Hicham MOHAMMADI¹, Nouredine HABTI² et
Mohamed FAID³**

*¹Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine et de Pharmacie,
19, rue Tarik bnou Ziad, Casablanca, Maroc*

*²Laboratoire d'Hématologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie,
Casablanca, Maroc*

³Laboratoire de biotechnologie alimentaire, I.A.V Hassan II, Rabat, Maroc

* Correspondance, courriel : z.souhaili@gmail.com

Résumé

L'espèce *Cystoseira tamariscifolia* est une algue brune marine qui constitue une biomasse algale importante sur la côte atlantique Marocaine. L'une des perspectives de notre étude sur cette algue était sa valorisation nutritionnelle en vue d'une exploitation économique comme valeur ajoutée aussi bien en alimentation humaine qu'animale à l'instar de plusieurs algues marines comestibles. Pour cette raison, nous avons été amené à étudier la toxicité aigue de cette espèce et déterminer sa DL₅₀ qui a été réalisée selon la méthode de Spearman-Kärber, en injectant par voie intra péritonéale à un groupe de 36 souris Swiss albinos, répartis en 6 lots de six souris chacun, une dose de 0.5 mL de l'extrait aqueux de l'algue à une concentration donnée, En parallèle une étude de l'effet cytotoxique de l'algue sur les cellules tumorales du myélome murin P3/X63-Ag8.653 a été réalisée en utilisant l'extrait aqueux de l'algue à différentes concentrations. Les résultats obtenus ont montré un net effet toxique de l'algue sur les souris avec une DL₅₀

738.61±34 µg d'algue /g de poids corporel. Nous avons aussi observé un effet cytotoxique de l'algue sur les cellules myélomateuses proportionnel aux concentrations utilisées.

Mots-clés : *Algue brune marine, Cystoseiracea, extraction, toxicité, cytotoxicité*

Abstract

Lethal effect of the aqueous extract of the brown marine algae (*Cystoseira tamariscifolia*) on the mouse and the myelom cells

Study of the acute toxicity of *Cystoseira tamariscifolia* a brown algae widely spread along the Moroccan Atlantic coast, was carried out on Swiss Albinos mice, the LD 50 was determined according to the method of Spearman-Kärber by injecting 0.5 ml of the aqueous algal extract to 36 mice organized in lots of 6 animals each for 6 concentrations and experiments were carried out in triplicates. Amounts of 0.5 ml of each concentration of the extract were injected to the mice intraperitoneally. The study of the cytotoxic effect was carried out on the myelom cells P3/X63-Ag8.653, using different concentrations of the extract. Results showed a toxic effect of the algae extract on mice with a LD 50 of 738.61±34 µg of the algae/g of body weight. The cytotoxic effect was also detected on the myelom cells; it's proportional to the used concentrations.

Keywords : *Brown marine algae, Cystoseiracea, extraction, toxicity, cytotoxicity.*

1. Introduction

Les algues brunes marines sont des algues largement répandues à travers le monde, ceci revient à leur faculté d'adaptation via leur reproduction et leur réponse à des conditions écologiques variées. Ceci suppose que les algues brunes sécrètent des substances chimiques de défense, contre les multiples dangers auxquels elles sont exposées (prédateurs mobiles, et micro-organismes envahisseurs) [1]. Ainsi

plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux différents aspects de défense de ces algues, surtout dans un but de recherche de substances naturelles à activités antimicrobiennes [2-7] ou encore à pouvoir toxique ou antitumoral [8-11].

Cystoseira, est un genre d'algue brune marine appartenant à la classe des Phéophycées; ordre des fucales. Il comprend 50 à 55 espèces dont *Cystoseira tamariscifolia* qui est appelée aussi *Cystoseira erricoidea* [12, 13], c'est une plante robuste de 10 à 50 cm de long, de couleur vert olive, produisant une sensation rude au toucher, c'est une espèce largement répandue sur la côte atlantique Marocaine [14] qui a suscité peu l'intérêt des chercheurs par comparaison à d'autres espèces d'algues brunes marines tel que *Bifurcaria bifurcata* [8, 10] ou *Cystoseira crinita* [4,5,7].

Les seules études effectuées sur *Cystoseira tamariscifolia* sont réalisées par Bennamara et al. [15] portant sur une étude chimique d'un principe actif purifié (un méroditerpène) et son effet antimicrobien sur *Escherichia coli* et *Botrytis cinerea* et les recherches effectuées par notre équipe portant sur l'activité antifongique et antimycotoxines de cette algue [16]. Toutefois, l'étude de l'effet toxique et cytotoxique de *Cystoseira tamariscifolia* n'a jamais été réalisée.

Notre étude a été réalisée dans un but de valorisation nutritionnelle de l'espèce *Cystoseira tamariscifolia* en vue d'une exploitation économique comme valeur ajoutée aussi bien en alimentation humaine qu'animale à l'instar de plusieurs algues marines comestibles. Pour cela une étude de son effet toxique et cytotoxique s'est avérée nécessaire.

L'étude de la toxicité aiguë de l'algue et sa DL50 a été réalisée sur son extrait aqueux par injection intrapéritonéale chez la souris Swiss albinos. L'effet cytotoxique a été réalisé sur des myélomes de souris en culture.

2. Matériel et méthodes

2-1. Récolte

La récolte de l'algue *Cystoseira tamariscifolia* a été effectuée entre le printemps et l'été, au niveau de la région de Témara (Oued Ykem) à basse mer. Le poids de la récolte a été estimé à 10 kg, le matériel frais est mis dans des sacs en plastique il a été ensuite rincé à l'eau douce plusieurs fois pour éliminer les sels minéraux et les contaminants avant d'être finement coupé et séché pendant 48h à une température ambiante d'environ 35°C à l'abri de la lumière solaire dans un endroit ombragé exposé au courant d'air sur un support de grille en bois, ensuite l'algue sèche a été conservée dans des sachets en papier fermés à l'abri de l'humidité et de la lumière.

2-2. Préparation de l'extrait

5g de l'algue sèche a été broyée dans un mortier avec 100mL d'eau distillée chaude la solution obtenue est mélangée à l'aide d'un vortex à 3 dimensions pendant une nuit et centrifugée ensuite à 3000g pendant 30 min, le surnageant récupéré subit une filtration stérilisante grâce à une membrane millipore 0.22 µm. Le filtrat est aliquoté dans des tubes eppendorf et immédiatement congelé à -20°C à l'abri de la lumière.

2-3. Test de toxicité aigue et DL50

2-3.1. Détermination de la DL50

Pour permettre une meilleure biodisponibilité du(es) principe(s) actif(s), le test de toxicité aigue a été réalisé par injection intra péritonéale de l'extrait algal à un groupe de 36 souris Swiss albinos de poids allant de 18 à 20g, élevées à l'animalerie du centre d'expérimentation de l'institut pasteur du Maroc. Les animaux ont été répartis en 6 lots, de six souris chacun, chaque lot de souris a reçu une injection de 0.5mL de l'extrait aqueux de l'algue à une concentration déterminée. Les concentrations étaient choisies de telle manière à mieux encadrer la DL50, on part d'une concentration à 100% de mortalité à une concentration à 0 % de

mortalité [17]. Les concentrations utilisées étaient de 5 %, 4.16 %, 3.47 %, 2.89 %, 2.41 % et 2.01 % obtenues par dilutions successives, selon un facteur de dilution de 1.2 à partir d'une solution mère de l'extrait aqueux à 5g/100mL, préparée comme décrit précédemment -chaque concentration a été testée 3 fois-. On enregistre les souris mortes pendant 48h et on calcule la dose létale 50 par la méthode de Spearman-Karber [17].

2-4. Toxicité cellulaire

La lignée cellulaire utilisée est la lignée myélomateuse P3/X63-Ag8.653, issue de la souris Balb/ C offerte par l'établissement de transfusion sanguine d'acquitaine-Bordeaux. Ce sont des cellules tumorales qui se multiplient indéfiniment dans le temps en échappant à l'apoptose.

Les cellules ont été cultivées dans des plaques de culture de six puits (Corning, EtatsUnis) à une concentration de $0,1 \cdot 10^6$ cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 (Eurobio, France) contenant du Sérum de Veau Foetal (SVF, Eurobio, France) à 15 %, de la L- Glutamine (Eurobio, France) à 2 mM, de la pénicilline (Eurobio, France) à 100 UI/mL et de la streptomycine (Eurobio, France) à 100µg/mL L'incubation en atmosphère humide à 37°C et à 5 % CO₂ dure 12 jours. Les cellules ne sont utilisées dans les tests que quand elles atteignent la phase exponentielle de croissance, soit une concentration de cellules allant de $0,5$ à $0,7 \cdot 10^6$ cellules/mL. Trois concentrations de l'échantillon ont été étudiées 1mg /mL, 2mg/mL et 5mg /mL. A partir de l'extrait aqueux de l'algue à 5g/100mL, on prélève respectivement 100µL, 200µl et 500µL qu'on met en présence du milieu RPMI avec les cellules du myélome murin de tel manière à obtenir un volume final de 5 mL. Ensuite, la boîte à 6 puits dans laquelle on a mis les échantillons (cellules de myélome en culture + extrait aqueux) et le témoin (contient les cellules de myélome en culture + eau distillée stérile), est étiquetée et incubée à 37°C. Les cellules ont été quotidiennement observées au microscope optique à statif inversé (Hund, wetzlar). La concentration cellulaire a été évaluée tous les 3 jours par numération cellulaire à l'aide d'une cellule de Malassez selon le principe d'exclusion au bleu trypan. Tous les tests ont été réalisés 3 fois.

2-5. Analyse statistique

L'analyse statistique de l'effet algue sur les cultures de cellules de myélome murin traitées par rapport aux cultures témoins a été effectuée par comparaison des résultats de la viabilité cellulaire en utilisant le test de X² à un seuil de probabilité de 0.05.

L'effet concentration de l'extrait algal sur les cultures cellulaires a été analysé par comparaison des moyennes de la viabilité cellulaire par le test ANOVA à un seuil de probabilité de 0.05.

3. Résultats et discussion

3-1. Test de toxicité aigue sur souris

3-1-1. Détermination de la DL₅₀

Les résultats de la détermination de la dose létale 50 (DL 50) moyenne effectuée à 3 reprises sur des souris ayant reçu 0.5 ml de l'extrait algal à différentes concentrations par voie intrapéritoniale sont représentés dans le **Tableau 1**. La DL₅₀ moyenne calculée par la formule de Spearman-Kärber est : 738.61 ± 34.03 µg d'algue /g de souris, donc il suffit d'une dose de 738.61µg d'algue /g pour tuer 50% de l'effectif total. Ceci suppose la présence de toxines dans l'extrait algal dont la nature reste à déterminer.

Pour chaque concentration de l'extrait aqueux de l'algue le test a été réalisé sur trois lots différents de 6 souris chacun. Pour une concentration de 5g/100ml on obtient 100% de mortalité des souris et pour une concentration de 2.1g/100ml on obtient 0% de mortalité, entre les deux on obtient un taux de mortalité proportionnel à la concentration.

Tableau 1 : Nombre de mortalité des souris après injection intrapéritoniale de 0.5 mL de l'extrait aqueux de l'algue à différentes concentrations

Dose en µg/g (souris)	Nombre de souris mortes par lots pour chaque test		
	Test 1	Test 2	Test 3
C1 =1250	6/6	6/6	6/6
C2 =1041.66	5/6	5/6	5/6
C3 =868.05	3/6	5/6	4/6
C4 =723.27	3/6	4/6	3/6
C5 =602.81	2/6	2/6	2/6
C6 =502.34	0/6	0/6	0/6
DL50	DL1= 768.61	DL2= 701.63	DL3=745.60

3-2. Test de cytotoxicité

Les cellules du myélome murin ont été mises en culture à la concentration de $0.1 \cdot 10^6$ cellules/mL. Les résultats de l'effet de l'extrait aqueux de l'algue à différentes concentrations sur la viabilité des cellules du myélome murin en fonction du temps sont présentés dans le **Tableau 2** et illustrés par la **Figure 1**. Le test de cytotoxicité a montré une diminution de la concentration des cellules viables dans le milieu de culture additionné de l'extrait de l'algue à différentes concentrations: 1mg/mL, 2mg/mL et 5mg/mL par rapport aux cultures témoins sans extrait algal. En effet, après comptage des cellules par la cellule de malassez, on constate une diminution significative très nette des cellules viables après culture en présence de l'extrait algal par rapport aux cultures témoins aussi bien pour le jour J3, J6, J9 que J12. Ceci d'une

part, d'une autre part, on constate que l'effet létal de l'extrait algal sur les cellules de myélome est proportionnel à la concentration de ce dernier dans le milieu de culture : la comparaison des cellules viables dans les cultures traités par les trois concentrations algales a montré une différence significative entre les concentrations 1mg/mL et 5 mg/mL et entre les concentrations 2mg/mL et 5mg/mL pour les jours J3, J6, J9 et J12 , par contre la différence de la viabilité pour les concentrations 1mg/mL et 2mg/mL ne sont pas significatives pour le jour J6.

Tableau 2 : Nombre moyen de cellules myélomateuses ($\times 10^3$)/mL en fonction du temps après leur culture en présence de différentes concentrations de l'extrait aqueux de l'algue

Jours	J0	J 3	J 6	J 9	J12
Extraits algaux					
Témoin	100	740± 45 ^a	1000± 25 ^a	700±20 ^a	300± 8 ^a
Extrait (1 mg/mL)	100	340± 35 ^b	318± 6 ^{bc}	350± 27 ^b	70± 3 ^b
Extrait (2 mg/mL)	100	280 ± 16 ^c	318± 3 ^{bc}	250± 10 ^c	60± 2.7 ^c
Extrait (5mg/mL)	100	100± 7 ^d	194± 1.5 ^d	120± 4 ^d	20± 1.85 ^d
Niveau de signification		P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05

a, b, c et d correspondent aux différences significatives entre les moyennes au niveau d'une même colonne

Ce résultat laisse penser à un effet antitumoral de l'extrait algal, ceci concorde avec les travaux de Kotaké et al.[10] qui ont montré que la fucoxanthine qui est un caroténoïde extraite des algues brunes a un important pouvoir antitumoral sur les cellules prostatiques cancéreuses

chez l'Homme. De même, l'équipe de Ayyad et al. [9,18] a pu purifier des algues brunes marine *Sargassium crispum* et *Cystoseira myrica* un mérodiptère qui possède un pouvoir cytotoxique, ce principe actif été aussi purifié de l'algue brune *Cystoseira baccata* par l'équipe de Mokrini et al. [19]. Par ailleurs, des études similaires effectuées sur l'algue brune *Bifurcaria bifurcata* ont montré que cette dernière contient des composés dotés d'importants pouvoirs cytotoxiques sur plusieurs lignées de cellules tumorales humaines en culture [8].

La représentation graphique de la viabilité des cellules du myélome murin dans les quatre milieux de culture (témoin et traité) en fonction du temps est illustrée par le graphe ci-dessous :

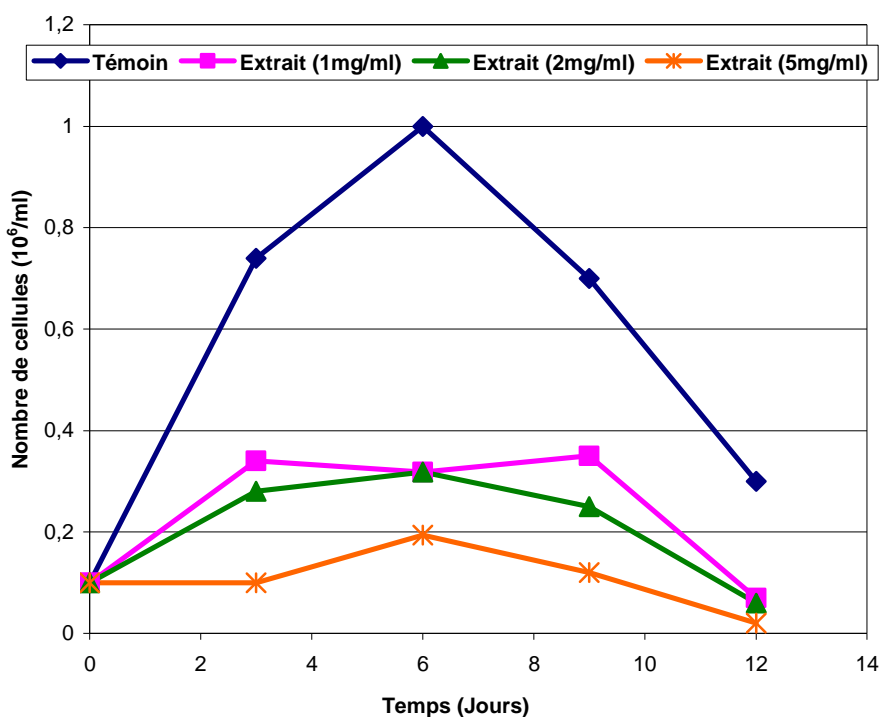


Figure 1: Viabilité en fonction du temps des cellules myélomateuses en culture en présence de l'extrait algal à différentes concentrations

4. Conclusion

D'après les résultats obtenus on peut conclure que l'algue *Cystoseira tamariscifolia* présente une toxicité nette sur la souris et donc il serait impossible de l'exploiter comme valeur ajoutée en alimentation humaine ou animale, toutefois sa cytotoxicité sur les cellules tumorales du myelome murin restent encourageants pour une étude antitumorale in vivo et la recherche d'un éventuel principe actif à caractère anticancéreux.

Références

- [1] - G. CULIOLI, C. VINCENT-CHABROL, L. PIOVETTI, R.VALLS, *Cryptogamie Algologie*, 19 (1998) 257-258
- [2] - J.F. BIARD, J.F. VERBIST, Y. LET OURNEUX, R. FLOCH, *Planta Med.* 40 (1980) 288-294
- [3] - P. LEBERTON , *Rev. Ecol. Terre vie*, 36 (1982) 4
- [4] - A. PRAUD, R.VALLS, L. PIOVETTI, B. BANAIGS, G. MALYNGAMIDE, *Tetrahedron Letters*, 34 (1993) 5437-5440
- [5] - A. PRAUD, R.VALLS, L. PIOVETTI, B. BANAIGS, J. BENAIM, *Photochemistry*, 40 (1995) 495-500
- [6] - G. OZDEMIR, Z. HORZUM, A.SUKATAR, N. KARABAY-YAVASOGLU, *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, 44(3) (2006) 183-188(6)
- [7] - Z. KAMENARSKAA, N. FUNDA, F.N. YALÇN, T. ERSOZ, I. CALIS, *Naturforsch.* , 57 (2002) 584-590
- [8] - A. DIGUARDIA, R. VALLS, V. MESGUICHE, J.M. BRUNEL, G. CULIOLI., *Tetrahedron Letters*, 40 (1999) 8359-8360
- [9] - S.E. AYYAD, M.O. SALMA, A.H.MOKHTAR, A.F. ANTER, *Biol Chim. Fram*, 140 (2001) 155-159
- [10] - N. KOTAKE, M. KUSHIRO, H. ZHANG, T. SUGAWARA, K. MIYASHITA, A. NAGAO, *J. Nutr.*, 131 (12) (2001) 3303-6

- [11] - G. CULIOLI, M. DAOUDI, A. ORTALO-MAGNE, R. VALLS, L. PIOVETTI, *Phytochemistry*, 57 (2001) 529-35
- [12] - P. DANGEARD, *Le botaniste*, 34 (1949) 89-198
- [13] - M. ROBERTS , *Phycol. Bull.* , 3 (1967) 245-366
- [14] - P. GAYRAL, *Bull. Soc. Sc. Nat. et Phys. Maroc*, 527p (1958)
- [15] - A. BENNAMARA, A. ABOURRICH, M. BERRADA, M. CHARROUF, N. CHAIB, M. BOUDOUMA, M. GARNEAU, *Phytochemistry* , 52 (1999) 37-40
- [16] - Z. SOUHAILI, M. LAGZOULI, M. FAID, K. FELLAT-ZARROUCK, *Afr. J .biotech.*, 3(1) (2004) 71-75
- [17] - JA. GENÉ, and A. ROBLES, *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños. Costa Rica*, 1 (1989) 35-40
- [18] - :AYYAD, O.B. ABDEL-HALIM, W.T. SHIER , T.R. HOYE, Z. *Naturforsch [C]*, 58(1-2) (2003) 33-38
- [19] - R. MOKRINI, M. BEN MESAUD, M. DAOUDI, C. HELLIO, J.P. MARÉCHAL, M. EL HATTAB, A. ORTALO-MAGNÉ, L. PIOVETTI , G. CULIOLI, *J. Nat. Prod*, 71 (11) (2008) 1806–1811