

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE,
SCIENCE DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE SCIENCES
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POST-GRADUATE AND TRAINING SCHOOL
OF LIFE
SCIENCE-HEALTH
AND ENVIRONMENT

POST-GRADUATE AND TRAINING UNIT
OF LIFE
SCIENCES-HEALTH

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE
THE BIOTECHNOLOGY CENTER

LABORATOIRE DE PHYTOPROTECTION ET DE VALORISATION DES RESSOURCES GENETIQUES
LABORATORY OF PHYTOPROTECTION AND VALORISATION OF GENETIC RESOURCES

Effets antioxydant, anti-inflammatoire et antitumoral des extraits polysaccharidiques de *Ganoderma resinaceum* Boud (*Ganodermataceae*)

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat/Ph. D en Biochimie
Spécialité : **Biotechnologie et développement**

Par

SIPPING KEMEGNE Marius Trésor

Matricule : 06R869
Master en Biochimie

Devant le Jury composé de :

Président: MBACHAM Wilfried, *Professeur,*

Rapporteur : NJAMEN Dieudonné, *Professeur,*

Membres : AGBOR Gabriel, *Directeur de Recherche,*

NGONDI Judith Laure, *Maître de Conférences,*
DJILOGUE Séfirin, *Maître de Conférences,*



Université de Yaoundé I;

Université de Yaoundé I;

Institut de Recherches
Médicales d'Etudes des
Plantes Médicinales ;
Université de Yaoundé I;
Université de Yaoundé I;

Année 2023

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail - Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

B.P. 812 Yaoundé

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace - Work - Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

B.P. 812 Yaoundé

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE THESE DE DOCTORAT/PhD

Nous, soussignés, Pr NGONDI Judith Laure et Pr MBACHAM Fon Wilfred respectivement Examineur et Président du Jury de thèse de Doctorat/PhD en Biochimie option Biotechnologie et développement, soutenue par Monsieur SIPPING KEMEGNE Marius Trésor (matricule 06R869) le 09 Juin 2023 à 09 heures dans la Salle Multimédia de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : « Effets antioxydant, anti-inflammatoire et antitumoral des extraits polysaccharidiques de *Ganoderma resinaceum* Boud (*Ganodermataceae*) », attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir ce que de droit.

Fait à Yaoundé le 12 JUL 2023

Examineur


Pr Ngondi Judith Laure
Maître de Conférences
Département de Biochimie
Université de Yaoundé I - Cameroun

Président du Jury


Prof. Mbacham Wilfred Fon
MS, DS, ScD (Harvard), FASI, FCAS, FAAS
Public Health Biotechnologist

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE,
SCIENCE DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE SCIENCES
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

POST-GRADUATE AND TRAINING SCHOOL
OF LIFE
SCIENCE-HEALTH
AND ENVIRONMENT

POST-GRADUATE AND TRAINING UNIT
OF LIFE
SCIENCES-HEALTH

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE
THE BIOTECHNOLOGY CENTER

LABORATOIRE DE PHYTOPROTECTION ET DE VALORISATION DES RESSOURCES GENETIQUES
LABORATORY OF PHYTOPROTECTION AND VALORISATION OF GENETIC RESOURCES

Effets antioxydant, anti-inflammatoire et antitumoral des extraits polysaccharidiques de *Ganoderma resinaceum* Boud (*Ganodermataceae*)

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat/Ph. D en Biochimie
Spécialité : **Biotechnologie et développement**

Par

SIPPING KEMEGNE Marius Trésor

Matricule : 06R869
Master en Biochimie

Devant le Jury composé de :

Président:	MBACHAM Wilfried, <i>Professeur,</i>	Université de Yaoundé I;
Rapporteur :	NJAMEN Dieudonné, <i>Professeur,</i>	Université de Yaoundé I;
Membres :	AGBOR Gabriel, <i>Directeur de Recherche,</i>	Institut de Recherches Médicales d'Etudes des Plantes Médicinales ;
	NGONDI Judith Laure, <i>Maître de Conférences,</i>	Université de Yaoundé I;
	DJIOGUE Séfirin, <i>Maître de Conférences,</i>	Université de Yaoundé I;

Année 2023

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2022/2023

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 31 MAI 2023

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA: ATCHADE Alex de Théodore, *Professeur*

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal,
Maître de Conférences

Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS :
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (43)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
11.	AZANTSA KINGUE GABIN Boris	Maître de Conférences	En poste
12.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
13.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14.	DJUJKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
15.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
16.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
18.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste

19.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
20.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
21.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
22.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
23.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

24.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
25.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
26.	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
27.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
31.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
32.	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
34.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35.	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
36.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

37.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
38.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
39.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
40.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Assistant	En Poste
41.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
42.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistant	En poste
43.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (52)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFIEF DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
22.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
23.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
24.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
25.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
26.	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUNSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGOU Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
42.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
43.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
44.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
45.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
46.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
47.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
48.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

49.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
50.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
51.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
52.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (34)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
12.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	En poste
13.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
14.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
16.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

19.	DJEUANI Astride Carole	Chargée de Cours	En poste
20.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
21.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
22.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24.	NSOM ZAMBO Epse PIAL Annie Claude	Chargée de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
25.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
26.	KABELONG BANAHO Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
27.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
28.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
29.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
30.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
31.	TEMEGNE NONO Carine	Chargée de Cours	En poste

32.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
33.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
34.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen FS Univ.Ngaoundere</i>
6.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
15.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
16.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
17.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
18.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
19.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
20.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
21.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
22.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste

23.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
24.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
25.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
26.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
27.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
28.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (37)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>

4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13.	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14.	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
15.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
16.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
17.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
18.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
19.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23.	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
24.	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

25.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
26.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
27.	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
28.	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
29.	OUAHOUO WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
31.	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33.	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
34.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
35.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

36.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
37.	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général/ MINESUP</i>

3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOU HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
15.	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
16.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
17.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur ENSET Ebolowa</i>
18.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

19.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
20.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21.	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
22.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	-----------------------	------------	----------------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UYI</i>

7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
17.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
19.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
20.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
21.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
22.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
23.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
24.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
25.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
26.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste

27.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
30.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
31.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
32.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste
33.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>

3.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
4.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
5.	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6.	KOUITCHEU MABEKU Epe KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste

8.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

10.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
11.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
12.	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
13.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargée de Cours	En poste
14.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
15.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
16.	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
17.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

18.	NKOUÉ TONG Abraham	Assistant	En poste
19.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistant	En poste
20.	EZO'O MENGO Fabrice Télésfor	Assistant	En poste
21.	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste
22.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23.	NGOUE NAM Romial Joël	Assistant	En poste
24.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	DJUIDJE KENMOE Epse ALOYEM	Professeur	En poste
3.	EKOBENA FOUDA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	HONA Jacques	Professeur	En poste
6.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
9.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
13.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14.	WOAFO Paul	Professeur	En poste

15.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16.	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18.	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19.	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27.	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UIYI</i>
30.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférences	<i>En stage depuis février 2023</i>

31.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
32.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
33.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
34.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
35.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
36.	FOUEJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
37.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
38.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	<i>Dir. Unité de production des réactifs/IMPM</i>
40.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste

42.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
43.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA /UDs</i>
2.	NDAM NGOUPAYOU Jules- Remy	Professeur	En poste

3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
7.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
8.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

9.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
11.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
12.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. d'Etat/MINMIDT</i>
14.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
15.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i>
16.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste
17.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
19.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
20.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
21.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
23.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
25.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

26.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
27.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29.	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
31.	MBESSE Cécile Olive	Chargée de Cours	En poste
32.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef Serv./Uté Maroua</i>
34.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
37.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste

40.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste
41.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
43.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS

DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	15 (11)	13 (03)	7 (05)	43 (20)
BPA	14 (01)	16 (09)	18 (04)	4 (02)	52 (16)
BPV	6 (01)	12 (02)	13 (07)	3 (00)	34 (10)
CI	7 (01)	15 (04)	5 (01)	1 (00)	28 (06)
CO	6 (01)	18 (04)	11 (04)	2 (00)	37 (09)
IN	2 (00)	2 (00)	14 (01)	4 (00)	22 (01)
MAT	1 (00)	8 (00)	17 (01)	7 (02)	33 (03)
MIB	2 (01)	7 (03)	8 (04)	7 (02)	24 (10)
PHY	15 (01)	15 (04)	11 (01)	2 (00)	43 (06)
ST	8 (00)	17 (03)	15 (04)	3 (01)	43 (08)
Total	69 (07)	125 (40)	125 (30)	40 (12)	359 (89)

Soit un total de	359 (89) dont :
- Professeurs	69 (07)
- Maîtres de Conférences	125 (40)
- Chargés de Cours	125 (30)
- Assistants	40 (12)

() = Nombre de Femmes

DEDICACE

À Mes parents

Mr KEMEGNE René

et

Mme MODJOM AUGUSTINE

Le savoir est de beaucoup la portion la plus
considérable du bonheur.

Sophocle

REMERCIEMENTS

L'élaboration de cette thèse n'a été possible sans la miséricorde et la protection de Dieu dont j'ai bénéficié face aux écueils rencontrés durant ces années. Au terme de cette aventure, j'exprime ma profonde reconnaissance et gratitude à l'endroit de (s) :

Pr BOUDJEKO Thaddée de regrettée mémoire, responsable du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Génétiques (LPVRG) du Centre de Biotechnologie (CBT) de l'Université de Yaoundé I et initiateur de ce travail de recherche. Qu'il me soit permis de lui témoigner ma reconnaissance pour l'encadrement, les conseils, la rigueur scientifique et le soutien qui ont été essentiels pour la réalisation de cette thèse ;

Pr NJAMEN Dieudonné, co-directeur de ces travaux de recherche, pour ses conseils, sa contribution scientifique, ses encouragements et sa patience tout au long de ce travail de thèse ;

Pr MBANYA Jean Claude, Directeur du CBT de l'Université de Yaoundé I (Cameroun) pour m'avoir accueilli et offert un cadre propice pour la réalisation de ce travail.

Pr MOUNDIPA FEWOU Paul, Chef du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I et tous les enseignants dudit Département, pour les connaissances transmises qui ont été fondamentales durant mes années d'études doctorales. Trouvez ici, l'expression de ma gratitude.

Pr LEKE Rose, responsable du Laboratoire d'Immunologie du CBT, et son équipe ; pour le suivi méthodologique et la technologie LUMINEX mise à notre disposition pour les essais immunologiques.

Pr SUMAN KAPUR, responsable du Laboratoire de génomique du *Birla Institute of Technology & Science, Inde* pour avoir offert le plateau technique nécessaire à la réalisation des tests de cytotoxicité.

Le Programme d'Appui aux Doctorants (PAD) dont le financement a servi à l'achat de quelques réactifs. Merci pour votre soutien et pour vos encouragements.

Pr ZINGUE Stéphane et Pr DJIOGUE Séfirin, pour l'accompagnement moral, le suivi méticuleux, et les critiques qui ont permis d'améliorer ces travaux de recherche ;

Pr EWANE Anne Cécile et Pr NANTIA AKONO Edouard pour la sympathie, le réconfort, le soutien moral durant les périodes de tribulation ;

Dr AYISSI Beudelair du Laboratoire de Mycologie de l'Université de Yaoundé I pour l'identification des échantillons de *Ganoderma resinaceum* ;

Mr TAKALA Jean-Pierre pour le temps consacré à la réalisation de la partie histologique de cette thèse ;

L'équipe du LPVRG, pour m'avoir soutenu pendant ces travaux de thèse, pour les moments de convivialité au laboratoire et le soutien lors des manipulations notamment Dr DJUIDJE Péguy, Dr MEDIESSE Francine, Dr TENE Martial, Dr MOUAFO Romaric, Mlle KANEMOTO Emery, Mr FANGUE George, Mlle DEMGNE Judith, Mlle KENMOGNE Vanelle, Mr FOKA Ebenezer, Mlle MAGNI Pacha, Mlle SOMBES Natia. Ce parcours aurait été beaucoup plus périlleux sans vous ;

Membres de l'équipe de recherche du Pr NJAMEN notamment : Dr AWOUNFACK Charline, Dr ZEMO Franklin, Dr SILIHE Kevine, Dr SIMO Valdès, Dr MAPTOUOM Laure, Mr NANBO Téléphore, Mr RIEPOUO Oumarou, Mr GUEMNANG Steve, Mme BAKAM Berlise, Mlle MOTOUM Florette, Mr DJIKEM Rudig, Mlle NDJENGUE Elisabeth, Mlle ATSAMA Perpétue pour l'ambiance au quotidien, l'assistance multiforme dans la réalisation des expérimentations *in vivo*, l'analyse des résultats et la correction du manuscrit.

Mes camarades de promotion, pour leurs précieux conseils et tout ce que l'on a partagé durant toutes ces années.

Mes ami (e)s Dr KOUAMO Mersimine, NGO BATJE Tatiana, Mr SINTAT Ange Michel et KONGUE Ronald dont les encouragements et l'aide m'ont été d'un grand soutien.

Mes très chers parents Mr KEMEGNE René et Mme MODJOM Augustine, vous qui n'avez ménagé aucun effort et qui m'avez soutenu financièrement, émotionnellement et spirituellement contre vents et marées. Trouvez ici le couronnement de vos années de sacrifice !

Mes frères et sœurs KEMEGNE Stanislas, FOWE Aurélien, MALEU Christelle, TIENCHEU Terence et GAKOU Chanzy, pour leur soutien multiforme et indéfectible dans tous les aspects de ma vie.

Les grandes familles FOWE et NKWOGNE pour l'affection, l'amour et la confiance manifestés en mon égard.

A tous ceux qui n'ont pas été nommément cités et dont l'accompagnement n'a pas été des moindres, recevez ma profonde gratitude.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	i
DEDICACE	xiii
REMERCIEMENTS	xiv
TABLE DES MATIERES	xvi
LISTE DES ABREVIATIONS	xix
LISTE DES ANNEXES	xxi
LISTE DES FIGURES	xxii
LISTE DES PHOTOS	xxiv
LISTE DES TABLEAUX	xxiv
RESUME	xxv
ABSTRACT	xxvi
INTRODUCTION	1
Chapitre I : Revue de la littérature	4
I.1. Monographie de <i>Ganoderma resinaceum</i>	4
I.1.1. Description mycologique et taxonomie	4
I.1.2. Répartition géographique et écologie	4
I.1.3. Méthodes de culture et cycle de développement	4
I.1.4. Utilisations en médecine traditionnelle	6
I.1.5. Travaux scientifiques antérieurs et activités biologiques	7
I.2. Polysaccharides	8
I.2.1. Définition.....	8
I.2.2. Classification des polysaccharides	8
I.2.3. Méthodes d'extraction des polysaccharides	10
I.2.4. Activités biologiques des polysaccharides	11
I.3. Stress oxydant	12
I.3.1. Généralités	12
I.3.2. Les radicaux libres : définition et origine	14
I.3.3. Stress oxydatif et pathogenèse.....	17
I.3.4. Mécanismes de défense contre les radicaux libres	20
I.3.5. Méthodologie d'étude des activités antioxydantes	22
I.4. Inflammation	25
I.4.1. Définition et étiologie.....	25

I.4.2. Typologie de l'inflammation	26
I.4.3. Les acteurs de l'inflammation	29
I.4.4. Approches thérapeutiques de l'inflammation	36
I.4.5. Modèles d'étude des activités anti-inflammatoires	38
I.4.6. Stress oxydatif, inflammation et cancers	39
I.5. Cancer.....	40
I.5.1. Définition et généralités.....	40
I.3.2. Epidémiologie.....	42
I.5.3. Typologie des cancers	42
I.5.4. L'hépatocarcinome	43
I.5.5. Chimio-prévention des cancers	46
I.5.6. Méthodologie d'étude des activités antitumorales	47
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	50
II.1. Matériel.....	49
II.1.1. Matériel végétal.....	49
II.1.2. Lignées cellulaires.....	49
II.1.3. Matériel Animal	49
II.1.4. Matériel de laboratoire	50
II.2. Méthodes.....	51
II.2.1. Organigramme de la méthodologie	51
II.2.2. Préparation de l'extrait brut des carpophores <i>Ganoderma resinaceum</i>	53
II.2.3. Préparation des extraits polysaccharidiques.....	53
II.2.4. Production du mycélium et préparation de l'extrait mycélien de <i>G. resinaceum</i> ..	54
II.2.5. Production et extraction des exopolysaccharides de <i>G. resinaceum</i>	56
II.2.6. Caractérisation chimique.....	57
II.2.7. Evaluation des activités antioxydantes.....	61
II.2.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	70
II.2.9. Evaluation de la cytotoxicité des extraits polysaccharidiques	75
II.2.10. Effets protecteurs des extraits polysaccharidiques contre l'hépatocarcinome induit au N-diéthylnitrosamine chez les rats mâles de souche Wistar	76
II.2.11. Analyses statistiques.....	86
Chapitre III : Résultats et discussion	88
III.1. Caractérisation chimique et effets antioxydants des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	89

III.1.1. Rendements d'extraction.....	89
III.1.2. Analyse phytochimique des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	89
III.1.3. Activités anti-radicalaires et antioxydantes des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	91
III.1.4. Effets des extraits polysaccharidiques sur quelques marqueurs du stress oxydatif <i>in vivo</i>	97
III.1.5. Discussion partielle 1	101
III.1.6. Conclusion partielle 1	106
III.2. Effets inhibiteurs des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> sur le processus inflammatoire.....	106
III.2.1. Effets protecteurs de la membrane des érythrocytes.....	106
III.2.2. Effets inhibiteurs de la dénaturation des protéines	107
III.2.3. Effets inhibiteurs de l'inflammation aigüe chez un modèle expérimental de rats induits à la <i>k</i> -carraghénine	108
III.2.4. Discussion partielle 2.....	114
III.2.5. Conclusion partielle 2	117
III.3. Effets cytotoxiques et chimiopréventifs des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> contre l'hépatocarcinome induit au N-diéthylnitrosamine chez les rats Wistar	118
III. 3.1. Effets cytotoxiques.....	118
III.3.2. Effets chimiopréventifs des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> contre l'hépatocarcinome induit au N-diéthylnitrosamine chez les rats Wistar	119
III.3.3. Discussion partielle 3	133
III.3.4. Conclusion partielle 3	138
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140
ANNEXES.....	A

LISTE DES ABREVIATIONS

AAPH :	“2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride”
ABTS :	Acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzylthiazoline-6-sulphonique
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AINS :	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS :	Anti-inflammatoires stéroïdiens
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ARNmi :	Acide Ribonucléique mitochondrial
BHT :	Butylhydroxytoluène
BITS :	“Birla Institute of Technology and Science”
BSA :	“Bovine Serum Albumin”
CBT :	Centre de Biotechnologie
CHC :	Carcinome hépatocellulaire
CPA :	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CUPRAC :	“Copper Reducing Antioxidant Capacity”
DEN :	N-diéthylnitrosamine
DMSO :	Diméthylsulphoxyde
DPPH :	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EAG :	Equivalent Acide Gallique
EG :	Equivalent de Glucose
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
eqBSA/mg :	Equivalent BSA/mg d'extrait sec
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESM :	Erreur Standard sur la Moyenne
FBS :	“Fœtal Bovine Serum”
FKN :	Fractalkine
FRAP :	“Ferric Reducing Antioxidant Power”
GPx :	Glutathion peroxydase
GRP :	“ <i>Ganoderma resinaceum</i> Polysaccharides”
GSH :	Glutathion
<i>i.p.</i> :	Injection intrapéritonéale
IFN :	Interféron
IL :	Interleukine

LPVRG :	Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Génétiques
L-RPMI	“L-Roswell Park Memorial Institute”
LT :	Leucotriènes
MCM :	“Mushroom Complete Medium”
MDA :	Malondialdéhyde
MEM :	“Minimum Essential Medium”
MFI :	“Median Fluorescence Intensity”
MTS :	5- (3-carboxyméthoxyphényl) -2- (4,5-diméthylthiazole) -3- (4 - sulfophényl) tétrazolium)
MTT :	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NCCS :	“National Centre for Cell Science”
NED :	N-(1-naphthyl)-éthylène diamine
NF- κ B :	“Nuclear Factor Kappa B”
NK :	“Natural Killer”
NO :	“Nitric Oxide”
ORAC :	“Oxygen Radical Absorbance Capacity”
PB :	Phénobarbital
PBS :	“Phosphate Buffer saline”
PDA :	“Potatoe’s Dextrose Agar”
PE :	Phycoérythrine
PG :	Prostaglandine
SOD :	Superoxyde dismutase
TBHQ :	Tertio-butylhydroquinone
TEAC :	“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”
TGF :	“Tumor Growth Factor”
TNF :	“Tumor Necrosis Factor”
TRAP :	“Total Radical Trapping Antioxidant Parameter”

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Origine et culture des lignées cellulaires utilisées.....	B
Annexe 2 : Composition de l'aliment des rats	C
Annexe 3 : Préparation des différents milieux de culture.....	C
Annexe 4 : Aspect morpho cultural et croissance du mycélium.....	D
Annexe 5 : Préparation des solutions.....	E
Annexe 6 : Table de Gay - Lussac	J
Annexe 7 : Courbes d'étalonnage et teneur en métabolites.....	J
Annexe 8 : Tableaux récapitulatifs des activités anti-radicalaires et antioxydantes des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	M
Annexe 9 : Tableaux récapitulatifs des activités anti-inflammatoires des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	N
Annexe 10 : Tableau récapitulatif des pourcentages d'inhibition de la prolifération des lignées cellulaires par les extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	O
Annexe 11 : Liste des publications issues de la thèse.....	Q

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de vie de <i>Ganoderma resinaceum</i>	6
Figure 2 : Structures chimiques de quelques polysaccharides fongiques	10
Figure 3 : Agents causatifs du stress oxydatif	13
Figure 4 : Origine extra et intracellulaire des radicaux libres	16
Figure 5 : Conséquences du stress oxydatif	17
Figure 6 : Mécanismes d'action des enzymes antioxydantes.....	21
Figure 7 : Inflammation aiguë	27
Figure 8 : Schéma du recrutement des leucocytes sur un site inflammatoire	35
Figure 9 : Etapes de la cancérogenèse.....	40
Figure 10 : Organigramme des différentes activités de recherche menées	52
Figure 11 : Protocole de préparation de l'extrait brut des carpophores de <i>G. resinaceum</i>	53
Figure 12 : Protocole de préparation des extraits polysaccharidiques	54
Figure 13 : Protocole de préparation de l'extrait mycélien de <i>G. resinaceum</i>	56
Figure 14 : Protocole d'extraction des exopolysaccharides	57
Figure 15 : Protocole de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	74
Figure 16 : Protocole de l'évaluation de l'activité antitumorale <i>in vivo</i> des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	78
Figure 17: Principe de la détection et quantification d'un marqueur par la technique ELISA en sandwich.....	81
Figure 18 : Principe de la détection et quantification des cytokines par Luminex	83
Figure 19 : Composition centésimale de quelques classes de métabolites présents dans les extraits bruts et polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	91
Figure 20 : Activité anti-radicalaire DPPH des standards (acide gallique et catéchine) et des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	92
Figure 21 : Activité anti-radicalaire ABTS des standards (acide gallique et catéchine) et des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	93
Figure 22 : Activité chélatrice des ions ferreux du standard EDTA des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	94
Figure 23 : Activité réductrice des ions ferriques des extraits polysaccharidiques des carpophores de <i>G. resinaceum</i>	95
Figure 24 : Activité de piégeage de l'oxyde nitrique du standard NaNO ₂ , des extraits de <i>G. resinaceum</i>	96

Figure 25 : Effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de <i>G. resinaceum</i> et de la vitamine C sur le taux de malondialdéhyde dans le plasma, le cœur, le foie, le cerveau, le rein et l'hémolysât.....	98
Figure 26 : Effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de <i>G. resinaceum</i> et de la vitamine C sur l'activité de la catalase dans le foie, le cœur, le cerveau, le rein et l'hémolysât.....	99
Figure 27 : Effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de <i>G. resinaceum</i> et de la vitamine C sur l'activité de la SOD dans le foie, le cœur, le cerveau et le rein.....	100
Figure 28 : Effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de <i>G. resinaceum</i> et de la vitamine C sur le taux d'oxyde nitrique dans le cerveau, le foie, et le rein.	101
Figure 29 : Pourcentages d'inhibition de la membrane des érythrocytes des extraits de <i>G. resinaceum</i> et de l'ibuprofène	107
Figure 30 : Pourcentages d'inhibition de la protéine (albumine de l'œuf) des extraits de <i>G. resinaceum</i> et du diclofénac de sodium	108
Figure 31 : Photomicrographies des tissus cutanés de la patte arrière gauche des animaux expérimentaux (HE × 400).....	110
Figure 32 : Effets des extraits de <i>G. resinaceum</i> (125 mg/kg) et du diclofénac de sodium (20 mg/kg) sur la production des cytokines et des chimiokines sériques.....	112
Figure 33 : Effets des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> (125 mg/kg) et du diclofénac de sodium (20 mg/kg) sur la production des cytokines et des chimiokines dans le tissu sous cutané.....	114
Figure 34 : Effets des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> sur la viabilité de quelques cellules tumorales.....	119
Figure 35 : Effets des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> sur l'évolution pondérale des animaux après 12 semaines d'expérimentation	120
Figure 36 : Courbe de survie de Kaplan Meir après 12 semaines d'expérimentation	121
Figure 37 : Photomicrographies des sections de tissus hépatiques des différents groupes expérimentaux après 12 semaines de traitement.....	122
Figure 38 : Nombre de veines porte avec infiltration leucocytaire dans les groupes expérimentaux	123
Figure 39 : Effets des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> sur les taux d'ALAT (a) ; ASAT (b) ; AFP (c) et de créatinine (d).....	124
Figure 40 : Effets des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> sur la production des cytokines et des chimiokines sériques.....	126

Figure 41 : Effets des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> sur quelques paramètres enzymatiques et non enzymatiques du stress oxydatif.....	128
--	-----

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Carpophore de <i>G. resinaceum</i> sur un tronc d'arbre	49
Photo 2 : Mycélium de <i>G. resinaceum</i> sur PDA après 7 jours.....	D
Photo 3 : Culture de <i>Ganoderma resinaceum</i> en milieu liquide après 7 jours.....	D

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Activités biologiques des extraits polysaccharidiques du genre <i>Ganoderma</i>	12
Tableau II : Quelques cellules immunitaires : caractéristiques, rôles et médiateurs libérés. .	22
Tableau III : Méthodes d'évaluation des activités anti-inflammatoires <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	39
Tableau IV : Modèles d'induction chimique d'hépatocarcinome chez les rongeurs.....	49
Tableau V : Répartition des rats et traitements.	67
Tableau VI : Etapes de coloration à l'hématoxyline et l'éosine... ..	86
Tableau VII : Rendements d'extraction en pourcentages des extraits par rapport à la masse de carpophore sec.... ..	89
Tableau VIII : Analyse qualitative des métabolites secondaires des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	90
Tableau IX : Concentrations effectrices 50 (CE ₅₀) des extraits de <i>G. resinaceum</i> et des standards	96
Tableau X : Effets des extraits de <i>G. resinaceum</i> et du diclofénac sodium (référence) sur l'œdème de la patte induit par la <i>k</i> -carraghénine chez les rats	110
Tableau XI : Cytotoxicité des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i>	119
Tableau XII : Effets des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> sur les paramètres hématologiques après 12 semaines de traitement.....	130
Tableau XIII : Effets des extraits polysaccharidiques de <i>G. resinaceum</i> sur la masse relative des organes frais (g/100 g PC) après 12 semaines de traitement.	132

RESUME

La prévalence des maladies liées au stress oxydatif et à l'inflammation telles que les cancers est sans cesse croissante dans les pays en développement. Les effets secondaires des traitements à long terme et le pronostic sévère des cancers favorisent l'émergence d'une approche préventive. Les composés bioactifs tels que les polysaccharides dérivés de champignons sont de plus en plus exploités en raison de leur faible toxicité et de leur large spectre d'activités biologiques. Parmi ces champignons *Ganoderma resinaceum* (*Ganodermataceae*) est utilisé pour traiter l'hypoglycémie, les maladies cardiovasculaires et hépatiques. La présente étude a été menée afin d'évaluer les effets antioxydant, anti-inflammatoire et antitumoral des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*. La première partie a consisté à évaluer les activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* des extraits polysaccharidiques. La seconde partie a consisté en l'évaluation de leur activité anti inflammatoire *in vitro* et *in vivo*. La troisième partie a consisté à évaluer leur potentiel cytotoxique et leur effet antitumoral sur un modèle expérimental d'hépatocarcinome. Les extraits brut (GRT) ; mycélien (MYC) ; exopolysaccharidiques (EPS I ; EPS II) et polysaccharidiques (GRP I et GRP II) ont été obtenus des carpophores naturels et par fermentation liquide. GRP I et GRP II ont présenté les teneurs les plus élevées en protéines, composés phénoliques et sucres totaux ; de meilleures activités antiradicalaires DPPH, ABTS ; chélatrice des ions métalliques et de piégeage de l'oxyde nitrique (NO) aux concentrations testées (25-200 µg/mL). A la dose 125 mg/kg, GRP I a présenté la meilleure activité antioxydante *in vivo* soit l'inhibition de la peroxydation lipidique, l'augmentation de l'activité de la catalase et de la superoxyde dismutase (SOD) en comparaison au contrôle négatif. En outre, GRP I et GRP II ont présenté les meilleurs effets inhibiteurs de la lyse de la membrane des érythrocytes murins et de dénaturation des protéines aux concentrations (100-500 µg/mL). À la dose de 125 mg/kg, GRP I et GRP II ont présenté une activité anti œdémateuse similaire caractérisée par la restauration d'une microarchitecture quasi normale des tissus sous cutanés et une modulation des cytokines/chimiokines inflammatoires (G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p70, éotaxine et fractalkine). GRP I et GRP II ont présenté également des effets cytotoxiques vis-à-vis des lignées de cellules cancéreuses MDA-MB 231, Hela et HepG₂ après 48 h d'incubation. A la dose 125 mg/kg, GRP II a montré le meilleur potentiel chimiopréventif en protégeant les tissus hépatiques des rats contre les dégâts causés par une intoxication au diéthylnitrosamine (DEN) ; en régulant la production des cytokines et des chimiokines inflammatoires et en inhibant le stress oxydatif. Ces résultats suggèrent un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et chimiopréventif des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

Mots clés : *Ganoderma resinaceum*, polysaccharides, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité antitumorale, hépatocarcinome.

ABSTRACT

The prevalence of diseases related to oxidative stress and inflammation such as cancers is constantly increasing in developing countries. The side effects of long-term treatment and the severe prognosis of cancers are driving the emergence of a preventive approach. Bioactive compounds such as polysaccharides derived from fungi are increasingly exploited because of their low toxicity and wide spectrum of biological activities. Among these fungi *Ganoderma resinaceum* (*Ganodermataceae*) is used to treat hypoglycaemia, cardiovascular and liver diseases. The present study was conducted to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumour effects of polysaccharide extracts of *G. resinaceum*. The first part consisted in the partial characterization and evaluation of the *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of the polysaccharide extracts. The second part consisted in the evaluation of their anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*. The third part consisted in evaluating their cytotoxic potential and their anti-tumour effect on an experimental model of hepatocarcinoma. Polysaccharide extracts of *G. resinaceum* fruiting bodies from the wild (GRP I and GRP II) showed the highest contents of protein, phenolic compounds and total sugars. These extracts showed the best DPPH, ABTS, metal ion chelating and NO scavenging activities at the various concentrations (25-200 µg/mL). At 125 mg/kg, GRP I and GRP II inhibited lipid peroxidation, reduced GSH levels, and increased catalase and SOD activity compared to negative control animals. In addition, GRP I and GRP II exhibited the best inhibitory effects on murine erythrocyte membrane lysis and protein denaturation at concentrations (100-500 µg/mL). At 125 mg/kg, GRP I and GRP II exhibited anti-oedematous activity characterized by restoration of near-normal microarchitecture of subcutaneous tissues and modulation of inflammatory cytokines/chemokines (G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p70, eotaxin, and fractalkine). GRP I and GRP II also showed cytotoxic effects against MDA-MB 231, Hela and HepG₂ cancer cell lines after 48 h of incubation. At the dose of 125 mg/kg, GRP I and GRP II showed chemopreventive potential by protecting rat liver tissues from damage caused by DEN intoxication; regulating the production of inflammatory cytokines and chemokines and inhibiting oxidative stress. These results suggest an antioxidant, anti-inflammatory and chemopreventive potential of polysaccharide extracts of *G. resinaceum*.

Keywords: *Ganoderma resinaceum*, polysaccharides, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, anti-tumour activity, hepatocarcinoma.



Introduction



INTRODUCTION

Les polysaccharides sont des composés organiques largement répandus dans la nature. Ils jouent un rôle prépondérant dans la croissance, le développement et les mécanismes de défense des plantes. Ils ont également été identifiés comme ingrédients actifs de nombreuses préparations traditionnelles à base de plantes médicinales (Xiaojuan *et al.*, 2012). La complexité de leurs structures leur confère un large spectre d'activités biologiques notamment immunomodulatrices, anti-inflammatoires, antioxydantes, antimicrobiennes, antivirales, anticancéreuses...(Boudjeko *et al.*, 2015 ; Jiao *et al.*, 2014b ; Zhang *et al.*, 2013). Les polysaccharides dérivés de champignons sont d'un intérêt remarquable en raison de leur structure de nature essentiellement glucane, présents dans la paroi sous forme de cellulose doués de propriétés immunomodulatoires et antitumorales (Chaitanya *et al.*, 2019 ; Pandya *et al.*, 2019). Ces propriétés justifient l'utilisation de certains β -glucanes à l'instar du lentinan, du calocyban, du pleuran, du ganoderan isolés respectivement de *Lentinus edodes*, *Calocybe indica*, *Pleurotus ostreatus* et *Ganoderma lucidum* comme potentiels immunomodulateurs dans la chimioprévention des cancers (Chakraborty *et al.*, 2021). En outre, les activités anti-cancéreuses d'autres polysaccharides isolés des champignons *Huaier fungus*, *Ganoderma atrum*, *Grifola frondosa*, *Astragalus membranaceus*, *Salvia miltiorrhiza* ont été mises en évidence (Li *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2015 ; Mao *et al.*, 2016 ; Wu *et al.*, 2019). Les polysaccharides de *G. lucidum* (GLP) inhibent la croissance des cellules tumorales hépatiques (HepG₂, BEL-7402 et Huh-7), soit en bloquant directement le cycle cellulaire soit indirectement en régulant le système immunitaire, ou en régulant les ARNmi hépatiques (Zhang *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2012 ; Shen *et al.*, 2014 ; Cai *et al.*, 2017). Cependant, l'urbanisation galopante, la dégradation des forêts au profit des cultures de rente, le caractère saisonnier de la production des champignons, la durée de leur cycle de développement rend difficile l'exploitation des métabolites des champignons. Des techniques de culture des champignons *in vitro* et de production des métabolites sont donc développées afin d'assurer leur disponibilité.

Les champignons supérieurs possèdent des parties fructifères charnues portant des spores (épigées ou hypogées) et bien visibles à l'œil nu (Cheung, 2013). De nos jours, plus de 140 000 espèces de champignons existent dans le monde dont seules 10% sont connues, parmi lesquelles 2000 espèces sont comestibles, et environ 650 espèces sont exploitées à des fins médicinales et pharmaceutiques (Wasser *et al.*, 2002). Parmi ces champignons d'intérêt médical figurent ceux appartenant à la famille des *Ganodermataceae* tels que *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma atrum*, *Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma applanatum*... Parmi ces

espèces, *G. resinaceum* est un basidiomycète lignicole dont les extraits alcoolique et aqueux ont des activités hypoglycémiantes, hépatoprotectrices, antibactériennes et antioxydantes. Ces activités biologiques justifient l'utilisation des carpophores de *G. resinaceum* en médecine traditionnelle sous forme de macérât et décocté pour traiter l'hypoglycémie, les maladies cardiovasculaires, les maladies hépatiques et les cancers (Paterson, 2006 ; Oyetayo, 2011 ; Guissou *et al.*, 2014).

Les cancers désignent un ensemble hétérogène de maladies invasives caractérisées par une prolifération anarchique de cellules anormales (Le *et al.*, 2018). Ils demeurent un problème de santé publique mondial car constitue la deuxième cause de mortalité dans le monde avec 19,3 millions de personnes atteintes et près de 10 millions de décès enregistrés en 2020. Au Cameroun, 1021 nouveaux cas et 955 décès ont été enregistrés en 2020 (GLOBOCAN, 2021). Du fait de leur forte exposition au virus de l'hépatite B ou C, de la pollution environnementale, au tabac, à l'alcool et la sédentarité, la prévalence des cancers tels que ceux du foie augmente sans cesse dans les populations des pays en développement. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est l'une des tumeurs malignes solides les plus fréquentes, représentant 80 à 90% des cancers hépatiques et la troisième cause de morbidité par cancer, entraînant près d'un million de décès chaque année (Zhao *et al.*, 2016). Le taux de survie après le diagnostic de cette maladie est très faible (~5%), car il est souvent diagnostiqué tardivement (Llovet *et al.*, 2003). L'un des facteurs étiologiques les plus importants du CHC est l'exposition à certains produits chimiques à l'instar des nitrosamines qui sont doués d'un fort potentiel cancérigène et mutagène. En effet, les espèces réactives oxygénées (ERO) issues de la biotransformation de ces substances induisent la mutation de l'ADN, la formation des cellules néoplasiques et des tumeurs (Ciemniak, 2006). D'autre part, l'agressivité d'un agent pathogène et sa persistance au site de l'infection peuvent entraîner une consommation accrue d'oxygène par les cellules immunitaires et une surproduction des ERO. Les cellules immunitaires recrutées au site de l'infection sécrètent les médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, les chimiokines, les ERO pour arrêter la propagation de la lésion (Akira *et al.*, 2006). Malgré la mise sur pied des méthodes de traitement du CHC telles que la chimiothérapie, la résection chirurgicale, le manque d'outils de diagnostic contribue à appauvrir leurs effets bénéfiques en clinique. De plus, les médicaments (le 5-fluorouracile, la cisplatine, la doxorubicine et le sorafenib) utilisés dans le traitement du CHC sont associés à une hépatotoxicité et des effets secondaires systémiques comme la cardiomyopathie (Zhou *et al.*, 2016). Les échecs de traitement du CHC sont dus à la forte vascularisation du foie favorisant des métastases intrahépatiques et extrahépatiques. Cette

situation a suscité l'émergence dans la communauté scientifique des thérapies moins toxiques et plus efficaces ciblant le stress oxydatif, l'inflammation et la prolifération des cellules tumorales à base de substances naturelles (Bishayee, 2012 ; Singh *et al.*, 2014).

Pour contribuer à la recherche de nouvelles substances alternatives naturelles dans la chimioprévention des cancers, nous nous sommes intéressés à *G. resinaceum*, basidiomycète appartenant à la famille des Ganodermatacées dont certaines espèces à l'instar du *G. lucidum* sont exploitées dans le traitement des cancers. Cependant, en se basant sur les activités antioxydantes, anti-inflammatoires des extraits de *G. resinaceum* et sur le fait qu'aucune étude n'ait été préalablement publiée sur les activités antitumorales des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*, les hypothèses suivantes ont été émises.

Question de recherche

Quel est peut-être le rôle des polysaccharides de *G. resinaceum* dans la chimioprévention des maladies liées au stress oxydatif et à l'inflammation comme les cancers ?

Hypothèses de recherche

Hypothèse 1 : Les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont des effets antioxydants.

Hypothèse 2 : Les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* atténuent l'inflammation.

Hypothèse 3 : Les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* inhibent la prolifération des cellules tumorales et protègent contre l'initiation du carcinome hépatocellulaire induit au N-diéthylnitrosamine.

Objectif général

Evaluer *in vitro* et *in vivo* les activités antioxydante, anti-inflammatoire et antitumorale des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

Objectifs spécifiques

1. Evaluer les activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ;
2. Déterminer le potentiel anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ;
3. Déterminer les effets cytotoxiques et chimiopréventifs des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur un modèle expérimental d'hépatocarcinome.



**Chapitre I :
Revue de la
littérature**



I.1. Monographie de *Ganoderma resinaceum*

I.1.1. Description mycologique et taxonomie

Le terme *Ganoderma* vient des mots grecs « *Ganos* » et « *derma* » qui signifie peau brillante en français. Il existe plus de 213 espèces de *Ganoderma* identifiées et répertoriées dans la base de données *Index Fungorum*. Les basidiocarpes des espèces de *Ganoderma* sont généralement réniformes, semi-circulaires ou flabelliformes avec une basidiospore à double paroi. Ils peuvent être laqués (*G. lucidum*) ou ternes (*G. applanatum*), stipités à insertion latérale comme *G. resinaceum*. De chair fibreuse et moelleuse, *G. resinaceum* (Ganoderme résineux) possède un chapeau s'étendant de 15 à 30 cm de large sur 10 à 20 cm de profondeur et environ 3 cm d'épaisseur plus ou moins bosselé. Son carpophore directement fixé sur l'hôte par le côté est caractérisé par une surface brillante et vernissée. Il est de couleur brun rougeâtre foncé en maturité. Il est non comestible de par sa saveur particulièrement amère et sa consistance ligneuse (Jankowski *et al.*, 2021). La classification phylogénétique de *G. resinaceum* est la suivante :

Règne : Fongique

Phylum : Basidiomycètes

Classe : Agaricomycètes

Ordre : Polyporales

Famille : Ganodermatacées

Genre : *Ganoderma*

Espèce : *resinaceum*

I.1.2. Répartition géographique et écologie

Ganoderma resinaceum est communément appelé *tiig-lalem*, *tiiglandgo* en langue Mooré (Afrique de l'Ouest) et « *Mvoum* » dans la région du Centre Cameroun. Il est répandu dans certaines parties du Nord et du Sud de l'Amérique, en Asie, en Australie et en Afrique. Au Cameroun, il est présent dans les régions du Centre, du Nord-Ouest et du Sud-Ouest du mois de Juillet au mois de Novembre (Guissou *et al.*, 2014 ; Kengni *et al.*, 2014). Ce champignon est un saprophyte qui vit et se développe essentiellement sur les souches, les troncs d'arbres secs à larges feuilles principalement après les saisons de pluie.

I.1.3. Méthodes de culture et cycle de développement

Le caractère saisonnier de la production de *Ganoderma* et la demande sans cesse croissante du fait de ses vertus thérapeutiques a poussé les scientifiques à domestiquer ce

champignon. Ainsi, plusieurs techniques de culture ont été développées au fil du temps en Asie.

I.1.3.1. La culture traditionnelle (sur billots)

C'est une méthode très ancienne qui consiste à modifier la production naturelle des champignons sur des billots de bois (Taithe, 2016). Elle s'effectue en plusieurs étapes :

➤ **Le Choix du substrat** : Le développement du mycélium et du sporophore dépend de la technique d'inoculation, la taille et l'espèce d'arbre utilisées. Les arbres sélectionnés doivent être sains, ne possédant pas de champignons parasites et devront être coupés en tronçons d'une longueur d'environ 150 cm pour 8 à 18 cm de diamètre (Aji, 2009).

➤ **L'inoculation** : Le mycélium estensemencé dans les orifices de buches de bois environ deux mois après la coupe et avant la saison de fructification de champignons indésirables. Chaque orifice doit être obstrué à l'aide d'un bouchon de bois ou de cire pour éviter l'évaporation et l'attaque des insectes.

➤ **L'incubation** : Les buches inoculées sont empilées de façon spécifique et placées dans un endroit idéal pendant 6 à 18 mois de façon à favoriser la croissance mycélienne. Le site choisi pour l'incubation doit être bien aéré et bien ventilé avec un taux d'humidité minimal de 25% et une température comprise entre 22 et 26°C.

➤ **La fructification** : Elle débute effectivement après un envahissement convenable du mycélium (80%) et l'apparition des premiers primordia (Taithe, 2016).

I.1.3.2. La culture sur milieux artificiels

C'est une technique qui consiste à cultiver les champignons dans des sacs autoclavables contenant des substrats tels que : la sciure de bois, la coque de soja, la paille de riz et des différents additifs d'origine agricole (céréales, farines, amidon, son de riz, son de blé, la bagasse de canne...). Les étapes de production sont : la stérilisation du substrat ; l'inoculation ; le développement et la fructification.

I.1.3.3. La culture submergée ou fermentation liquide

Cette technique de culture est une avancée biotechnologique notoire car elle offre de nombreux avantages : la production de biomasse et de biomolécules dans un espace limité, en réduisant les risques de contamination et dans un temps relativement court. Le rendement et la vitesse de production dépendent de la nature, du pH du milieu de culture, de la température du milieu ambiant, de la taille de l'inoculum, de l'aération et du type de champignon.

I.1.3.4. Cycle de développement

Le cycle de vie des espèces de *Ganoderma* comporte deux phases, une dite haploïde (le mycélium primaire est issu d'une spore méiotique haploïde) et la deuxième phase dite diploïde caractérisée par la formation du mycélium secondaire (Figure 1). Ce cycle de vie se résume en trois étapes principales :

➤ **La plasmogamie** qui consiste à la fusion de deux cellules haploïdes sexuellement compatibles, après une division nucléaire conduisant à la conversion du mycélium monocaryon (homocaryon) en mycélium dicaryon (ou hétérocaryon).

➤ **La caryogamie** : Dans les conditions environnementales et nutritionnelles optimales, le basidiocarpe se forme à partir du mycélium dicaryon et après formation des basides qui sont des cellules spécialisées caractéristiques des basidiomycètes.

➤ **La méiose** : Elle aboutit à la formation d'une tétrade de spores méiotiques sexuées puis à des basidiospores. À la fin de la sporogénèse, les spores sont libérées dans le milieu environnant (Money, 2016).

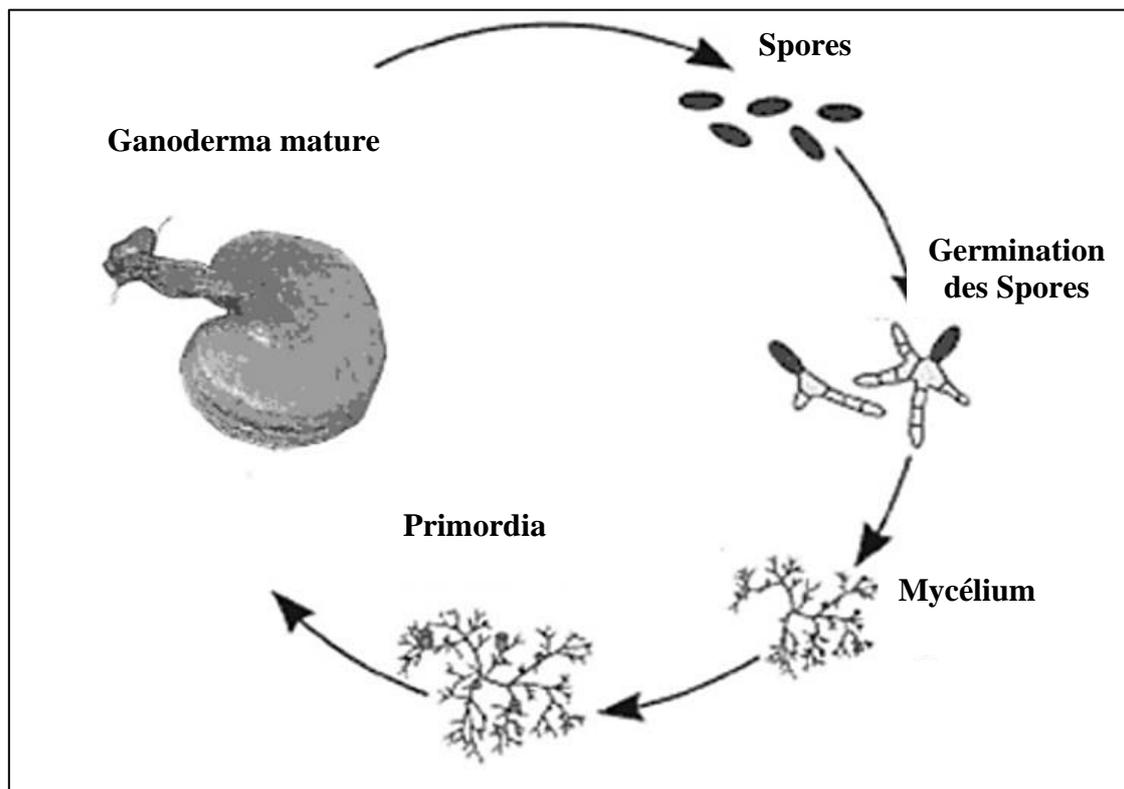


Figure 1 : Cycle de vie de *Ganoderma* (www.mushroompalace.com).

I.1.4. Utilisations en médecine traditionnelle

Les champignons du *Ganoderma* sont utilisés depuis des siècles en Asie pour promouvoir la longévité des êtres vivants. À cet effet, l'espèce *Ganoderma lucidum* (*Lingzhi* ou *Reishi*) a

été qualifié de « champignon de l'immortalité » ou « Elixir des Dieux ». *G. resinaceum* est utilisé en mycothérapie sous forme de macérât et décocté aqueux et alcoolique en Afrique de l'Ouest pour traiter l'hypoglycémie, les maladies cardiovasculaires et hépatiques (Paterson, 2006 ; Oyetayo, 2011 ; Guissou *et al.*, 2014).

I.1.5. Travaux scientifiques antérieurs et activités biologiques

Les travaux menés sur les souches de *G. resinaceum* ont révélé que ses extraits éthanoliques inhibent la peroxydation lipidique, l'activité de la lipoxygénase et chélatent les ions ferreux de manière dose-dépendante (Saltarelli *et al.*, 2015). Les extraits au méthanol et aqueux de *G. resinaceum* ont présenté une forte capacité antioxydante totale due à leur richesse en composés phénoliques tels que : l'apigénine, l'acide benzoïque et la catéchine (Zengin *et al.*, 2015). En outre, les extraits à l'eau chaude de *G. resinaceum* inhibent la peroxydation lipidique, l'action de conversion de l'angiotensine et l'activité de l'acétylcholinestérase (Kozarski *et al.*, 2020). *G. resinaceum* stimule le système immunitaire, protège le foie contre les dommages, diminue la pression sanguine et inhibe la synthèse du cholestérol (Loyd *et al.*, 2018). Peng *et al.* (2013) ont évalué les effets de divers terpènes de *G. resinaceum* sur les lésions hépatiques induites par H₂O₂ dans les cellules HepG₂ et ont constaté que la ganodérésine B (15,00 µM), le ganodérol B (33,20 µM) et la lucidone A (82,10 µM) ont des activités hépatoprotectrices se traduisant par une inhibition de la surproduction d'ALAT et d'ASAT dans les cellules HepG₂ induite par H₂O₂. De plus, Niu *et al.* (2007) ont isolé deux nouveaux lanostoïdes des carpophores de *G. resinaceum* ayant une activité cytotoxique vis à vis des cellules hépatiques HepG₂ avec une concentration inhibitrice 50 (IC₅₀ = 2,5 µg/mL). Silva *et al.* (2013) ont montré que les endopolysaccharides de *G. resinaceum*, *Phlebia rufa*, et *Trametes versicolor* affectent le taux de prolifération différentielle des cellules HepG₂ en stabilisant leur croissance. Les extraits à l'eau chaude de *G. resinaceum* présentent aussi une cytotoxicité sélective significative vis-à-vis des cellules tumorales HeLa et K56 par rapport aux cellules mononucléaires normales du sang périphérique humain (Kozarski *et al.*, 2020).

I.1.4.2. Données phytochimiques

L'analyse phytochimique des extraits de *G. resinaceum* révèle la présence de métabolites divers dont les plus importants sont : les polysaccharides, les terpénoïdes et les composés phénoliques. Les travaux de Chen *et al.* (2017) ont révélé la présence de six nouveaux nortriterpénoïdes et d'un dérivé de triterpénoïdes de type lanostane qui ont été séparés et

purifiés des basidiocarpes de *G. resinaceum*. Certains de ces composés ont montré une activité inhibitrice significative de l' α -glucosidase protégeant ainsi contre l'hépatotoxicité. D'autre part, un β -glucane soluble dans l'eau (DESSK5) et un ergostane de type stéroïde ont été isolés du basidiocarpe de *G. resinaceum* (Amaral *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2017). Récemment, les travaux de Bleha *et al.* (2022) ont révélé que les polysaccharides isolés et purifiés des extraits à l'eau froide des carpophores de *G. resinaceum* sont de structure mannogalactane tandis que ceux issus de l'extrait à l'eau chaude et à la solution d'hydroxyde de sodium à 1 M sont de structure β -glucane.

I.2. Polysaccharides

I.2.1. Définition

Les polysaccharides encore appelés polyosides sont définis comme des structures glucidiques polymériques composées d'unités mono-osidiques répétitives reliées par des liaisons glycosidiques. Chaque polysaccharide est caractérisé par un degré de polymérisation bien déterminé et un type de liaison entre les monomères. Les polysaccharides représentent l'une des familles de molécules biologiques les plus complexes en termes de structure ce qui leur confère de nombreuses propriétés biologiques. Les unités répétitives des polysaccharides peuvent être des oses neutres (glucose, galactose, xylose, fucose...), des oses acides (glucuronique, galacturonique, iduronique...) ou des hexosamines (N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine). Des structures de motifs non glucidiques de nature organique (acétate, lactate, pyruvate, succinate) ou inorganique (phosphate, sulfate...) peuvent également s'associer de façon covalente à certains hydroxyles secondaires des monosaccharides constitutifs (Tinamri et Lagmi, 2014).

I.2.2. Classification des polysaccharides

Les polysaccharides peuvent être classés sur la base de leur structure, leur composition chimique, leur source, leur application et leur localisation cellulaire (Liu *et al.*, 2015).

➤ Selon la structure

Les polysaccharides sont classés en deux types : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides.

- Les homopolysaccharides sont constitués d'un seul type de monosaccharide. Nous avons les glucanes qui sont des polymères de glucose ; les galactanes qui sont des polymères de galactoses et les xylanes des polymères de D-xylose.

- Les hétéropolysaccharides ou hétéroglycanes sont constitués de plus d'un type de monosaccharides tels que l'héparine constitué d'acide α -L-idopyranosyluronic 2-sulfate et 2-désoxy-2-sulfoamino- α -D-glucopyranose 6-sulfate.

Les polysaccharides peuvent être classés aussi en fonction de l'atome de carbone anomérique. Nous avons : les α -glucanes (ex. : amidon, cellulose ou chitine) et les β -glucanes constitués de résidus β -(1-3)-D- glucopyranosyl avec différents degrés de ramifications et β -(1-6)-D-glucopyranosyl.

➤ **Selon la fonction**

Les polysaccharides peuvent être classés selon leur fonction biologique en deux groupes :

- Les polysaccharides de réserve : Chez les êtres vivants, la molécule source d'énergie est principalement le glucose qui est mis en réserve sous forme d'amidon chez les végétaux et de glycogène chez les animaux.

- Les polysaccharides structuraux : Il s'agit de la cellulose (liaison β 1-4) dont l'assemblage forme des fibres constituant les parties rigides des tissus végétaux ; de la chitine constituée de glucosamines et formant l'exosquelette des arthropodes.

➤ **Selon la localisation cellulaire**

➤ **Chez les bactéries**

Les bactéries synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés en trois grands groupes selon leur localisation dans la cellule : le premier groupe rassemble les polysaccharides du cytosol (source de carbone et d'énergie à la cellule) représentés essentiellement par le glycogène bactérien ; le second groupe concerne les constituants de la paroi tels que les acides téichoïques et les peptidoglycanes ; le troisième groupe réunit les polysaccharides élaborés par la cellule et sécrétés dans le milieu extérieur (Delattre, 2005).

➤ **Chez les champignons**

Les polysaccharides représentent environ 75% de la biomasse fongique. La plupart des polysaccharides fongiques se trouvent associés à la membrane et à la paroi cellulaire. Ils servent de composés structuraux et de matériel de cimentation : ce sont les polysaccharides intracellulaires ou endopolysaccharides. D'autres par contre peuvent être produits dans le milieu extérieur et accumulés comme matériel mucilagineux (excrétion cellulaire) : ce sont les exopolysaccharides ou polysaccharides extracellulaires (Scherba & Babitskaya, 2008). Les principaux polysaccharides fongiques sont essentiels des β -glucanes (Figure 2). Ce sont : le pullulane, le schizophyllane, le scléroglycane, le botryosphaerane, le lentinane, le grifolane et le lasiodiplodane isolés respectivement de *Aureobasidium pullulans*, *Schizophyllum*

commune, *Sclerotium sp*, *Botryosphaeria rhodina*, *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* et de *Lasiodiplodia theobromae* (Stoica *et al.*, 2023).

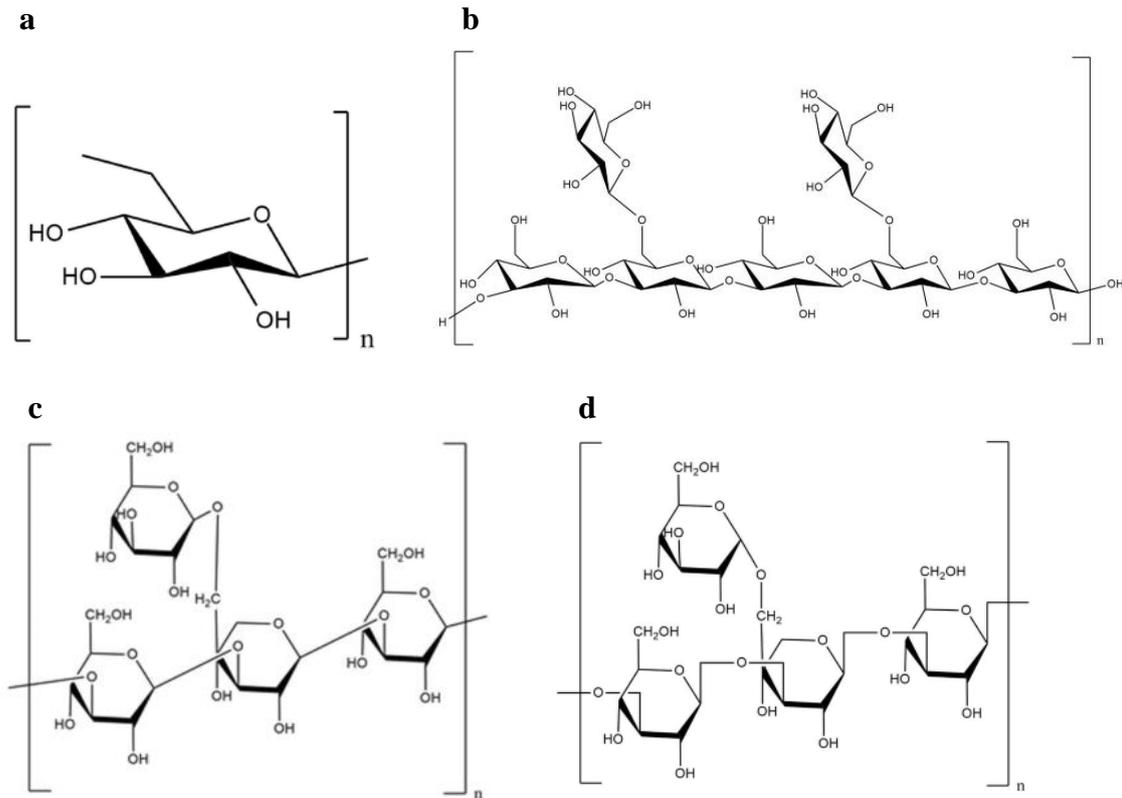


Figure 2 : Structures chimiques de quelques polysaccharides fongiques.

(a) Lasiodiplodane; (b) Lentinane ; (c) Scleroglucane; (d) Schizophyllane.

I.2.3. Méthodes d'extraction des polysaccharides

L'intérêt croissant pour l'exploration des structures et des activités biologiques des polysaccharides fongiques a conduit au développement de diverses méthodes d'extraction. Elles sont réparties en deux catégories : les méthodes d'extraction traditionnelles et les méthodes d'extraction assistée (Liu *et al.*, 2022).

I.2.3.1. Méthodes d'extraction traditionnelle

Ces techniques présentent l'avantage d'être simples à utiliser et nécessitent un équipement de faible coût.

➤ **Extraction à l'eau :** La solution aqueuse est largement utilisée pour extraire les polysaccharides avec ou sans prétraitement avec des solvants organiques (méthanol, éthanol, acétone...) pour éliminer les lipides et les phénols ; ce qui facilite la séparation des polysaccharides des autres composés de la paroi cellulaire. L'eau chaude suivie d'une précipitation à l'alcool est la plus utilisée en raison de son faible coût et de sa facilité de

manipulation. Les polysaccharides fréquemment extraits sont des complexes hétéropolysaccharides-protéines présents dans la couche externe de la paroi cellulaire.

➤ **Extraction acide ou alcaline :** Le pH de la solution permet de solubiliser sélectivement les groupes de métabolites qui sont par la suite extraits par partition liquide-liquide à l'aide d'un solvant organique non miscible à l'eau. Cette méthode est couramment utilisée pour obtenir une grande quantité de β -glucane dans la couche intermédiaire. Par exemple, des β -glucanes avec des particules globulaires de petite taille ont été obtenus à partir de *Lentinula edodes* et *Pleurotus ostreatus* par un traitement acide-base suivi d'une ébullition avec 0,5 M de NaOH (Shaheen *et al.*, 2022).

I.2.3.1. Méthodes d'extraction assistée

Elles présentent de nombreux avantages notamment : la réduction de la durée de la manipulation, l'augmentation du rendement d'extraction et l'amélioration des activités biologiques des polysaccharides. Cependant, ces méthodes nécessitent un équipement sophistiqué et présentent un coût élevé. Il s'agit de : l'extraction assistée par micro-ondes ; l'extraction assistée par ultrasons ; l'extraction assistée par enzymes ; l'extraction à l'eau sous-critique ; l'extraction assistée par champ électrique pulsé, l'extraction par eau à haute pression et l'extraction par solvant eutectique profond. Il existe également des méthodes combinées telles que : l'extraction synergique ultrasons-micro-ondes ; l'extraction sous-critique ; l'extraction sous-critique ; l'extraction sous-critique associée à l'eau chaude sous pression et l'extraction à l'eau chaude associée à la pression (Gong *et al.*, 2020).

I.2.4. Activités biologiques des polysaccharides

Les végétaux supérieurs et inférieurs constituent une source intarissable de molécules naturelles bioactives parmi lesquelles les polysaccharides. Ils occupent une place de choix dans le domaine biomédical à cause de leur faible toxicité et leurs multiples propriétés biologiques consignées dans le tableau I.

Tableau I : Activités biologiques des extraits polysaccharidiques du genre *Ganoderma*.

Champignons	Sources	Polysaccharides	Activités biologiques	Références
<i>Ganoderma atrum</i>	Carpophores	β -(1-3)-, (1-6) Glucose avec α -(1-4) Galactose	Antioxydantes	Zhang <i>et al.</i> , 2012
		Homo et hétéroglucanes	Antioxydantes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Kozarski <i>et al.</i> , 2011; Ping <i>et al.</i> , 2009
<i>Ganoderma lucidum</i>	Carpophores	///	Inhibe la surproduction d'IL-6 ; TNF- α et stimule celle d'IL-2 ; IL-4 et IL-10.	Pan <i>et al.</i> , 2013
		α -(1-6)- ; (1-2,6) Galactose β -(1-3)-, (1-4,6) Glucose	Immunostimulantes	Ye <i>et al.</i> , 2010
		///	Anti-diabétique	Zhang <i>et al.</i> , 2003
		Extracellulaire	β -D-(1-3)-Galactomannane α -(1-4)-D-Galactose	Hépatoprotectrice
<i>Ganoderma atrum</i>	Carpophores	///		Zhu <i>et al.</i> , 2016
<i>Ganoderma formosanum</i>	Mycélium	Homoglucane branché	Antimicrobienne	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Ganoderma lucidum</i>	Mycélium	Sous fraction WE GL-G1	Anti-obésité	Chang <i>et al.</i> , 2015
	Spores	///	Neuroprotecteur	Zhou <i>et al.</i> , 2012
<i>Ganoderma tsugae</i>	Mycélium	Hétéro-polysaccharides	Antitumoral	Peng <i>et al.</i> , 2003
<i>Ganoderma lucidum</i>	Carpophores	///	Actif contre l'hépatocarcinome cellulaire induit par irradiation	Yu <i>et al.</i> , 2017
		Mycélium	Hétéro-polysaccharides	Cytotoxique vis à vis de la lignée HepG ₂

I.3. Stress oxydant

I.3.1. Généralités

Chez les organismes vivants, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites en permanence lors des processus physiologiques tels que la respiration et le métabolisme des xénobiotiques. Ces ERO proviennent essentiellement de nos pratiques quotidiennes (irradiation, pollution, traumatisme, sédentarité, activité physique intense) et mauvaises

habitudes alimentaires (consommation excessive d'alcool, tabagisme, obésité). Elles ont également des origines internes telles que les infections microbiennes, l'inflammation chronique, une exposition aux xénobiotiques ou le manque d'une hormone, d'un facteur de croissance (Figure 3). Ces ERO sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (HO^*), soit des molécules à savoir : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroperoxyde (ROOH) ou l'oxygène singulet (1O_2) (Islam *et al.*, 2019). Le déséquilibre entre la production des pro oxydants (de radicaux libres, métabolites réactifs, ERO) et leur élimination par des mécanismes de protection, dénommés antioxydants est appelé stress oxydatif (Reuter *et al.*, 2010). Un faible taux d'ERO assuré par un équilibre entre leur production et leur élimination est nécessaire pour maintenir un organisme sain (Savoie, 2008).

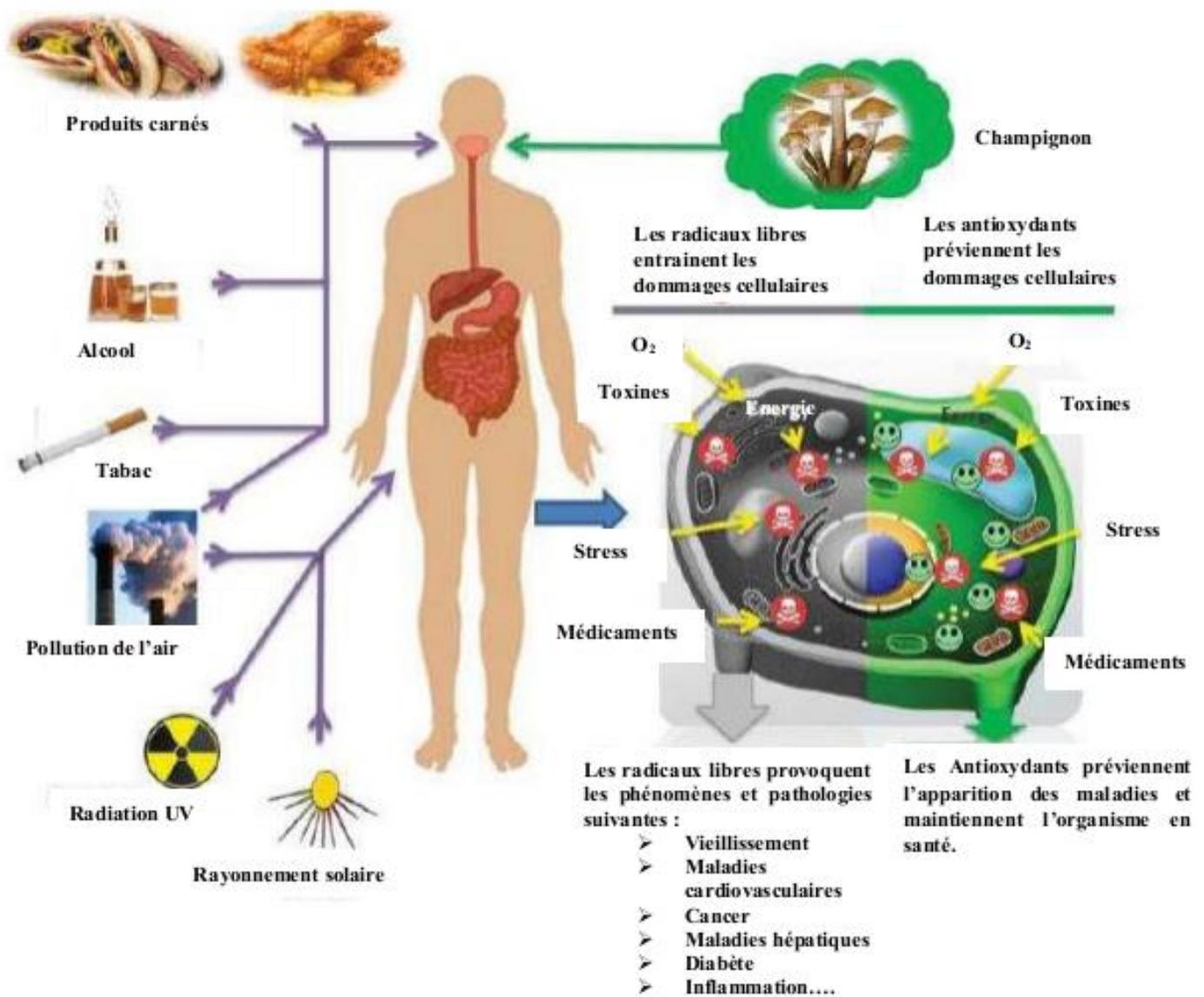


Figure 3 : Agents causatifs du stress oxydatif (Islam *et al.*, 2019).

I.3.2. Les radicaux libres : définition et origine

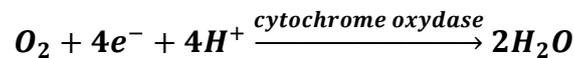
Les radicaux libres sont des molécules ou atomes possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Ils sont très réactifs et formés par fission homolytique ou par oxydoréduction (Haleng *et al.*, 2007). Les radicaux libres jouent un rôle primordial dans la vie cellulaire à travers leur implication dans la signalisation cellulaire et le système de défense de l'organisme (Morel *et al.*, 2018). Cependant, les radicaux libres à l'origine de la perturbation de l'homéostasie cellulaire ont des origines diverses et variées.

I.1.2.1. Origine endogène

Dans les cellules vivantes, les phénomènes physiologiques tels que la respiration mitochondriale, l'exacerbation des processus inflammatoires, l'augmentation du taux de fer libre et d'autres métaux de transition peuvent générer des radicaux libres (Bensakhria, 2018).

➤ La respiration mitochondriale

Le déplacement des électrons à travers les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire du NADH à l'oxygène, provoque un déplacement de protons de la matrice mitochondriale jusqu'à l'espace intermembranaire et la formation de l'eau. Cette réaction est catalysée par l'enzyme cytochrome oxydase :



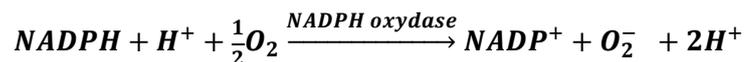
Ces électrons peuvent également former avec l'oxygène des radicaux libres appelés anion super oxydes (0,4 à 4% de l'oxygène consommé) selon la réaction :



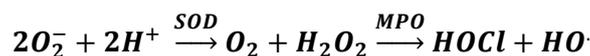
Cette production s'accroît en cas d'effort physique, d'hyperoxie, de désordres inflammatoires ou nutritionnels (carence en ubiquinone) (Favier, 2003 ; Haleng *et al.*, 2007 ; Bensakhria, 2018).

➤ L'inflammation

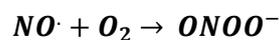
Durant ce processus, les cellules phagocytaires activées produisent une quantité abondante d'anion superoxyde au niveau de la membrane cellulaire sous l'action du complexe enzymatique NADPH oxydase.



Dans les conditions normales, l'anion superoxyde participe à la lutte anti-infectieuse en assurant la phagocytose. En effet, à l'intérieur de la vacuole phagocytaire, l'anion superoxyde est dismuté en peroxyde d'hydrogène qui sous l'action de la myéloperoxydase (MPO) va former l'acide hypochloreux (HOCl) responsable de la destruction de l'agent pathogène (Dupré-crochet *et al.*, 2013).



Les neutrophiles produisent aussi via l'action des oxyde nitrique synthases (NOS) le monoxyde d'azote qui est à l'origine d'une molécule plus réactive, le peroxydinitrite (ONOO⁻), un puissant oxydant qui peut se décomposer pour former le radical hydroxyle.

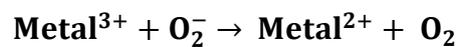
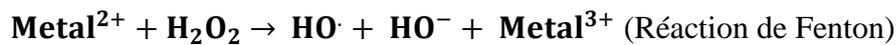


I.1.2.2. Origine exogène

Les radicaux libres peuvent également avoir des origines exogènes à travers le rayonnement X et UV du soleil, l'ozone, la pollution atmosphérique, le tabagisme, les métaux lourds, les pesticides et les xénobiotiques (Figure 4).

➤ Les métaux lourds

Certains métaux lourds (chrome, cuivre, cadmium, cuivre, fer...) peuvent interagir avec l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux hydroxyles selon la réaction d'Haber Weiss/Fenton.



Equation bilan : $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}\cdot + \text{HO}^-$ (Réaction d'Haber Weiss).

➤ Les rayonnements

Les radiations ionisantes génèrent les radicaux libres soit par photolyse de l'eau (rayons X ; γ) ou par activation des molécules photosensibilisantes (rayons UV). Les radicaux libres générés sont absorbés par des chromophores qui sont excités et fournissent un oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) qui est très réactif. Ils induisent également la réduction de l' O_2 en O_2^- qui est dismuté ensuite en H_2O_2 sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD). Le radical hydroxyle formé par réduction de H_2O_2 interagit avec les molécules biologiques (ADN, protéines et lipides) pour causer des dommages tissulaires (Birben *et al.*, 2012).

➤ La pollution

L'ozone (O_3) est un gaz peu hydrosoluble, très réactif qui est formé par la réaction photochimique dans l'air à partir de monoxyde d'azote (NO) et de composés organiques volatiles. L'ozone possède des effets délétères sur la santé humaine à travers notamment son action sur les composés tels que la vitamine C, l'acide urique et le glutathion réduit présents dans le fluide péri-ciliaire qui recouvre l'épithélium bronchique (Bensakhria, 2018).

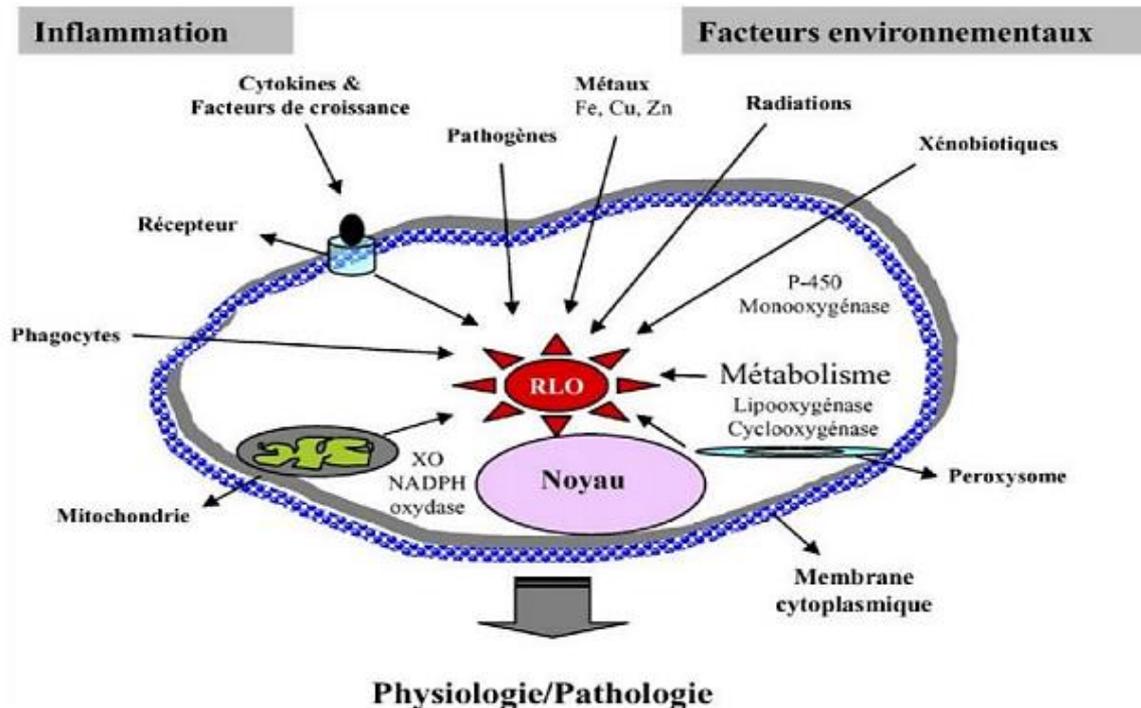


Figure 4 : Origine extra et intracellulaire des radicaux libres (Afonso *et al.*, 2007).

I.3.3. Stress oxydatif et pathogenèse

Une surproduction des ERO couplée ou non à un déficit d'antioxydants due par exemple à une dérégulation du métabolisme de l'oxygène est nocif pour l'organisme (Figure 5). En effet, les cibles des ERO sont les acides nucléiques, les protéines et les lipides causant ainsi des lésions et par conséquent une perturbation de l'homéostasie cellulaire (Baralti, 2015). Les ERO interagissent avec les protéines par oxydation, glycation pour former des adduits modifiant ainsi leur structure et donc leur fonction. Les glucides et les lipides peuvent également être oxydés pour former des composés carbonylés. Avec l'ADN, les ERO oxydent les bases azotées, entraînent la cassure des brins provoquant ainsi des mutations. Ces altérations moléculaires et tissulaires accélèrent le vieillissement et accroissent considérablement le risque d'apparition des pathologies telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, l'ostéoporose, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les maladies neurodégénératives et les maladies inflammatoires (Sanchez, 2017 ; Forrester *et al.*, 2018).

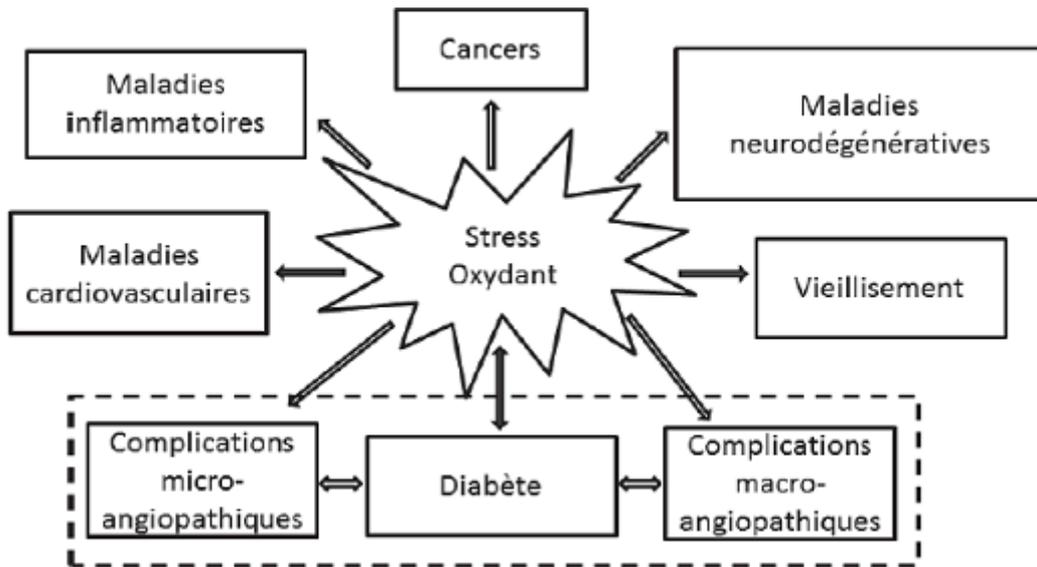


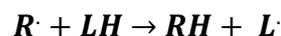
Figure 5 : Conséquences du stress oxydatif (Favier, 2006 ; Tan *et al.*, 2018).

I.1.3.1. Dommages sur les lipides

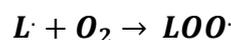
Les membranes cellulaires de par leur richesse en lipides sont les cibles primaires des ERO. Ainsi, les acides gras polyinsaturés (AGPI) en raison de leur degré élevé d'insaturations sont très sensibles à l'oxydation formant des composés tels que l'isoprostane et le malondialdéhyde (MDA) très réactifs, qui sont des marqueurs de la peroxydation lipidique (Ayala *et al.*, 2014). Cette réaction radicalaire se déroule en plusieurs étapes :

➤ L'initiation

Le radical libre initiateur de la réaction (R^\bullet), réagit avec les atomes d'hydrogène présents sur les lipides membranaires (LH) en captant un hydrogène pour donner un lipide avec un électron libre (L^\bullet).

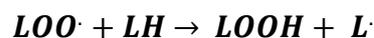


Le radical L^\bullet réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde (LOO^\bullet) selon l'équation suivante :



➤ L'élongation

Le radical LOO^\bullet peut réagir sur une molécule lipidique formant un LOOH (hydroperoxyde) et un nouveau site radicalaire selon l'équation suivante :



➤ La terminaison

Ce radical peut à son tour réagir avec l'oxygène, engendrer un nouveau radical peroxyde qui attaquera un nouveau lipide. La fin de la réaction est marquée par la fixation du radical par un antioxydant ou la combinaison de deux radicaux.



La peroxydation lipidique peut être non enzymatique ou enzymatique (catalysée par les cyclooxygénases et les lipoxygénases). Elle endommage la membrane plasmique, perturbe l'homéostasie et provoque ainsi la mort cellulaire (Kalyanaraman, 2013).

I.2.3.2. Dommages sur les protéines

Les ERO ont une réactivité différentielle vis à vis des protéines selon la nature constitutive de leurs acides aminés. L'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine disposent d'une meilleure affinité avec les ERO d'où leur réactivité élevée. En effet, l'oxydation des protéines par les ERO peut se faire soit par introduction dans la chaîne peptidique d'un groupe carbonyle à travers les produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-hydroxynonéal (HNE) ; soit par le clivage des chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. Ces transformations sont généralement irréversibles et conduisent à des modifications des structures et des fonctions des protéines affectées comme la non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, la perte d'activité enzymatique. Parmi les protéines oxydées, une partie est peu dégradée, forme des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et le compartiment extracellulaire.

I.1.3.3. Dommages sur les acides nucléiques

Les acides nucléiques tels que l'ADN nucléaire ou l'ADN mitochondrial constituent une cible préférentielle des radicaux libres. Les bases azotées constitutives de l'ADN sont sensibles à l'oxydation, c'est le cas de la guanine qui peut interagir avec le radical HO• par exemple. L'attaque radicalaire peut être directe ; l'oxydation des bases entraîne alors la formation de 8-oxoguanine, 8-nitroguanine ou de formamidopyrimidine... qui peuvent s'apparier à l'adénine et non à la cytosine. Cette réaction provoque ainsi des mutations et par conséquent des altérations de l'information génétique impliquées dans le vieillissement et des pathologies à l'instar du cancer (Bensakhria, 2018). D'autre part, les radicaux libres peuvent former avec la base azotée un site abasique, ou s'attaquer au désoxyribose entraînant une rupture de la chaîne. La molécule d'ADN peut aussi subir des dommages indirects dus aux aldéhydes mutagènes issus de la peroxydation lipidique qui forment des adduits sur les bases

de l'ADN de type MDA-guanine. L'oxydation des protéines telles que les histones qui protègent la molécule d'ADN ou des enzymes, des facteurs de réplication ou de transcription entraîne la formation des bases de type lysinoguanine sur la molécule d'ADN (Favier, 2003).

I.3.4. Mécanismes de défense contre les radicaux libres

L'organisme dispose d'un arsenal de défense antioxydante contre les effets nocifs des radicaux libres. Un antioxydant est une substance capable de freiner ou de stopper l'oxydation d'un substrat oxydable en agissant à faible concentration. Ces systèmes de défense ont soit une origine exogène (le système de défense non enzymatique), soit une origine endogène (le système de défense enzymatique).

I.3.4.1. Système de défense non enzymatique

Les antioxydants non enzymatiques agissent en empêchant ou en inhibant la formation et la propagation des radicaux libres. Ils peuvent être synthétisés mais sont généralement apportés par l'alimentation. Il s'agit des caroténoïdes, des oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium, magnésium et manganèse), des polyphénols, des vitamines A, C et E. Les antioxydants non enzymatiques peuvent également être synthétiques, il s'agit notamment du butyl-hydroxy-toluène (BHT), du butyl-hydroxy-anisole (BHA) et du tertio-butylhydroquinone (TBHQ) utilisés comme additifs dans l'industrie alimentaire pour inhiber l'oxydation des lipides (Sajon *et al.*, 2018).

➤ **Vitamine C ou acide L-ascorbique** est un antioxydant hydrosoluble, présent sous sa forme ascorbate anionique au pH physiologique. Il limite la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes et régénère la vitamine E par réduction spontanée du radical tocopheryl (Powers et Jackson, 2008).

➤ **Vitamine E ou tocophérol** est un antioxydant liposoluble qui protège les membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique en neutralisant les radicaux peroxydes (Khalil, 2002).

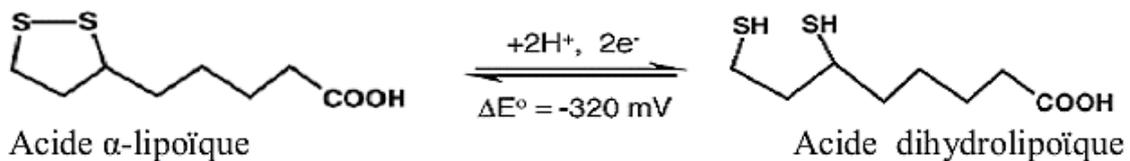
➤ **Glutathion (GSH)** : Son potentiel antioxydant est dû à son habilité à fournir l'hydrogène, ce qui lui permet de réduire les radicaux libres et de jouer un rôle important dans la détoxification cellulaire. Ainsi, il est abondant dans les organes de détoxification de l'organisme comme les reins, le foie et les poumons. Il intervient également dans le cycle de régénération des deux vitamines C et E. Le glutathion constitue également la première ligne de défense contre la toxicité des métaux dans l'organisme (Nimse *et al.*, 2015).

➤ **Oligoéléments** : Ils jouent essentiellement un rôle de cofacteurs des enzymes antioxydantes pour maintenir leur activité catalytique.

➤ **Polyphénols** : Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents beaucoup plus dans les végétaux. Il s'agit entre autres des anthocyanines retrouvées dans les fruits rouges, des flavonoïdes retrouvés dans les agrumes. Ils exercent leurs activités antioxydantes en piégeant les radicaux libres et en chélatant les métaux de transition.

➤ **Caroténoïdes** : La richesse de ces composés en doubles liaisons conjuguées leur confère une activité antioxydante importante. Elles peuvent interagir avec les radicaux libres (ROO[•], RO[•]) par captation d'hydrogène, transfert d'électron ou addition du radical (Valko *et al.*, 2007).

➤ **Acide lipoïque (acide 1,2-dithiolane-3 pentanoïque)** : Dans les tissus vivants, l'acide lipoïque est absorbé et réduit en une forme dithiol, l'acide dihydrolipoïque. Il intervient dans le piégeage des ERO, la restauration des antioxydants endogènes et exogènes (vitamines C, E et le glutathion), la chélation des métaux (Cu²⁺, Fe²⁺) (Valko *et al.*, 2007).



I.1.4.2. Système de défense enzymatique

Plusieurs molécules enzymatiques endogènes majoritaires peuvent préserver l'organisme contre les ERO (Figure 6). Il s'agit des :

➤ **Superoxydes dismutases (SOD)** : Ce sont des métalloprotéines localisées dans la cellule ; elles constituent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. Il en existe trois (03) types : la SOD à cuivre et à zinc (Cu, Zn-SOD) intracellulaire qui agit essentiellement dans l'espace intermembranaire mitochondrial où il y a une accumulation de protons ; une SOD à cuivre et à zinc extracellulaire jouant un rôle important dans la protection des surfaces cellulaires et des protéines de la matrice extracellulaire et une SOD à manganèse (Mn-SOD) située à la fois dans la matrice et au niveau interne de la mitochondrie (Isabel *et al.*, 2010).

➤ **Glutathion peroxydases (GPxs)** : Synthétisée dans les reins et le foie, la GPx est une sélénoprotéine qui assure l'élimination des peroxydes lipidiques issus de l'oxydation des acides gras polyinsaturés.

➤ **Catalases** : Elles sont localisées dans les peroxysomes des eucaryotes chez tous les organismes aérobies. Ce sont des enzymes hémiques qui catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène protégeant ainsi la cellule des effets délétères (Birben *et al.*, 2012).

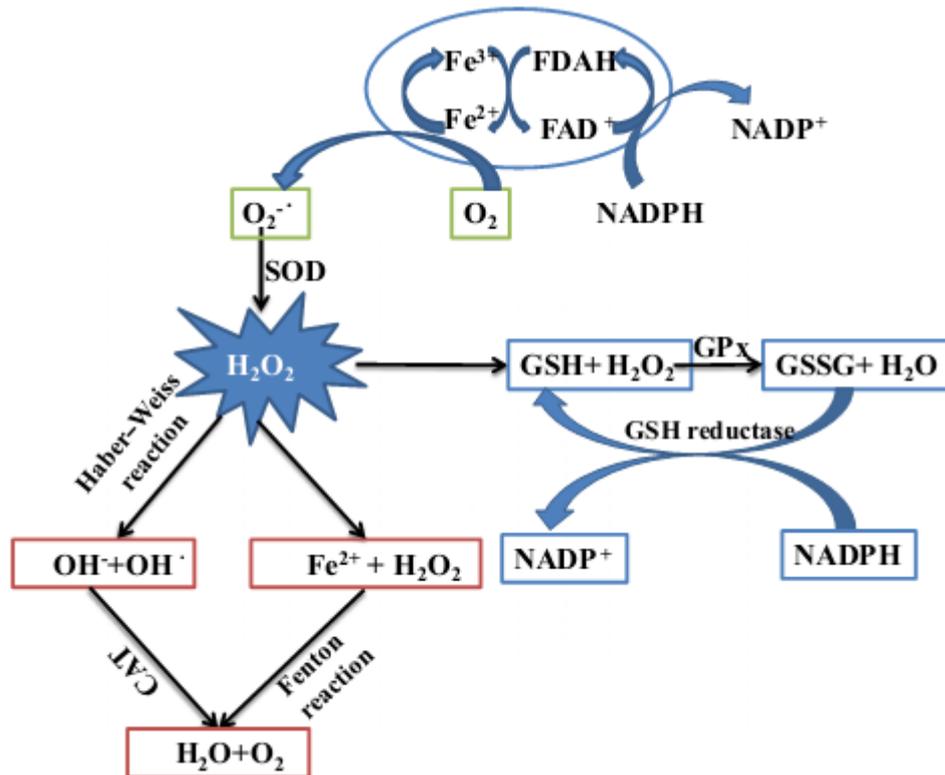


Figure 6 : Mécanismes d'action des enzymes antioxydantes (Zhang *et al.*, 2017).

I.3.5. Méthodologie d'étude des activités antioxydantes

La validation de l'activité antioxydante d'une substance se fait suite à des tests sur plusieurs modèles. A cet effet, une grande variété de méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante a été développée notamment les modèles *in vitro*, les modèles cellulaires et les modèles *in vivo*.

I.3.5.1. Modèles d'étude *in vitro*

Les tests antioxydants *in vitro* peuvent être classés en deux catégories : les tests basés sur le transfert d'électrons (TE) et les tests basés sur le transfert d'atomes d'hydrogène (TAH). Ils sont largement utilisés en raison de leur stabilité, leur simplicité et leur reproductibilité (Munteanu *et al.*, 2021).

➤ **Tests basés sur le transfert d'électrons** : Ils reposent sur la capacité des antioxydants éventuels à transférer un électron et à réduire certains composés, y compris les carbonyles, les métaux et les radicaux. Par spectrophotométrie, la variation de la coloration suite à la

réduction d'un oxydant par un antioxydant est évaluée. L'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzylthiazoline-6-sulphonique (ABTS) ou «Trolox equivalent antioxidant capacity» (TEAC) et le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) sont des tests de décoloration couramment utilisés (Brand-williams *et al.*, 1995), tandis que le pouvoir réducteur ferrique (FRAP) et la capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC) sont des tests de colorisation où il y a une augmentation de l'absorbance à une longueur d'onde prédéterminée lorsque l'antioxydant réagit avec le réactif (Apak *et al.*, 2004).

➤ **Tests basés sur le transfert de protons :** Ils reposent sur la capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres. L'activité antioxydante peut être déterminée à partir de la cinétique de compétition en mesurant la courbe de décroissance de la fluorescence de la sonde en absence et en présence d'antioxydants. Parmi ces tests, nous distinguons le test de la capacité d'absorption des radicaux libres (ORAC), le test TRAP "Total Radical Trapping Antioxidant Parameter" utilisant la R-phycoérythrine comme sonde fluorescente, le test de blanchiment de la crocine utilisant le "2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH)" comme générateur de radicaux et le test de blanchiment du β -carotène (Prior *et al.*, 2005).

I.3.5.2. Modèles d'étude cellulaires

Les cultures cellulaires sont de plus en plus utilisées comme substrat pour évaluer les mécanismes sous-jacents du stress oxydatif et pour mettre en évidence les mécanismes des agents antioxydants contre divers types d'oxydation. L'avantage de ces modèles réside dans la possibilité d'étudier différents types de cellules, divers facteurs d'oxydation et des modèles de maladies spécifiques. Les phénomènes tels que la mort cellulaire, la répression de la génération des ERO, l'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN sont les principaux indicateurs des effets des antioxydants dans les modèles cellulaires. De manière pratique, soient les antioxydants et l'agent stressant sont simultanément ajoutés au milieu de culture cellulaire ; soient les cellules sont pré-incubées avec les antioxydants pour lui permettre de s'incorporer aux cellules (Niki, 2010).

I.3.5.3. Modèles d'étude *in vivo*

In vivo, les capacités antioxydantes des substances sont affectées par de nombreux facteurs, dont l'un des plus importants est la biodisponibilité. Les antioxydants doivent être absorbés, transportés, disséminés et retenus correctement dans l'organisme, les liquides biologiques, les cellules et les tissus. La biodisponibilité et les effets de différents antioxydants ont été évalués chez des animaux (rats, souris, lapins, cobayes...). Les stimuli

les plus employés dans ces modèles sont : la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), l'alloxane, le tert-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), la streptozotocine (STZ), un régime hyperlipidémique, l'éthanol et le D-galactose (Zhang *et al.*, 2017).

➤ **Modèle d'induction à la 6-OHDA** : La neurotoxine (6-OHDA) induit le métabolisme de la dopamine générant ainsi des radicaux libres cytotoxiques. En effet, la 6-OHDA réagit avec l'oxygène pour donner H₂O₂ et HO· qui causent des dommages dans les cellules dopaminergiques. L'un des marqueurs clés d'évaluation du stress oxydatif induit par la 6-OHDA est le malondialdéhyde (MDA). L'induction se fait généralement par injection unilatérale de la 6-OHDA dans le faisceau médian droit du cerveau antérieur après traitement des animaux par une combinaison de kétamine et de xylazine (Mansouri *et al.*, 2013).

➤ **Modèle d'induction à l'alloxane** : L'alloxane est un inducteur de diabète insulino-dépendant. Cette substance peut réagir avec deux groupes thiols dans le site de fixation de la glucokinase pour former des ponts disulfures qui inactivent l'enzyme. L'induction peut se faire par injection par voie intrapéritonéale d'une solution fraîchement préparée d'alloxane. Le mécanisme antioxydant dans ce modèle consiste en l'inhibition de la réaction de Fenton au cours de laquelle H₂O₂ génère le radical HO· en présence d'ions Fe²⁺ (Rohilla, 2012).

➤ **Modèle d'induction au t-BHP** : Le *t*-BHP ou *t*-BuOOH peut être métabolisé en radicaux libres intermédiaires par le cytochrome P450 (dans les hépatocytes) ou l'hémoglobine (dans les érythrocytes) provoquant ainsi la peroxydation lipidique qui perturbe l'intégrité des membranes cellulaires. L'induction peut se faire en injectant par voie intrapéritonéale une dose de 0,5 mmol/kg PC de *t*-BHP chez les rats (Kim *et al.*, 2015).

➤ **Modèle d'induction à la streptozotocine** : La streptozotocine est une substance chimique nocive qui provoque une hyperglycémie chez les animaux. Elle provoque une déphosphorylation rapide de l'ATP associée à l'oxydation de la xanthine générant ainsi les radicaux O₂⁻, H₂O₂ et HO·. Le stress oxydatif peut être induit par administration d'une solution de streptozotocine à la dose de 50 mg/kg (dans le tampon citrate 0,1 M ; pH 4,5) par voie intrapéritonéale chez les rats mis à jeun pendant 24 h (Rao *et al.*, 2017).

➤ **Modèle d'induction à un régime hyperlipidémique** : Le stress oxydatif est un facteur important de la pathophysiologie des dysfonctionnements cardiovasculaires, l'athérosclérose et l'inflammation... Un régime hyperlipidémique peut accroître le taux de cholestérol et de LDL et une hypercholestéromie peut contribuer à l'oxydation des acides gras en acétyl-CoA, substrat primaire de la synthèse du cholestérol (Stancu *et al.*, 2014).

➤ **Modèle d'induction à l'éthanol** : L'éthanol est un facteur exogène agressif qui induit la formation des ERO tels que l'anion superoxyde, la peroxydation lipidique et la dégradation

de la matrice extracellulaire impliquées dans les lésions de la muqueuse gastrique. L'éthanol module l'activité de la GPx, entraînant la formation de H₂O₂. (Takayama *et al.*, 2016).

➤ **Modèle d'induction au D-galactose** : Le D-galactose est un sucre réducteur qui peut facilement réagir avec les amines libres des acides aminés et des peptides pour former des produits finaux de glycation avancée. L'injection de D-galactose induit des changements assimilables à un vieillissement accéléré chez les rongeurs. Au cours du métabolisme cellulaire, le galactose est réduit en galactitol sous l'action de l'aldose réductase ; convertit en D-galacto-hexodialdose et H₂O₂ sous l'action de la galactose oxydase. Les produits formés s'accumulent dans la cellule et provoquent un stress osmotique, ce qui entraîne une perturbation du métabolisme des sucres et des ERO. Ce modèle de vieillissement peut causer des troubles neurologiques, une diminution des activités enzymatiques antioxydantes et un affaiblissement des réponses immunitaires (Ho *et al.*, 2003).

I.4. Inflammation

I.4.1. Définition et étiologie

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des processus et des mécanismes de défense mis en œuvre par un organisme pour lutter contre l'attaque d'éléments étrangers d'origine physique (chaleur, froid, rayonnement UV, X, trauma...) ; chimique (toxines, venins...) ou biologique (microorganismes, cellules tumorales ou endommagées). Ces stimuli entraînent généralement des lésions tissulaires, des dommages cellulaires et constituent ainsi le signal de déclenchement de la réponse immunitaire. Ce système complexe peut être inné correspondant à une réponse immunitaire dite « non spécifique », car elle agit sans distinction de l'agent étranger. Elle constitue la première ligne de défense de l'organisme et ne confère pas de mémoire à l'organisme. L'immunité acquise, quant à elle, est plus spécifique et fait intervenir des médiateurs spécialisés (Murphy et Weaver, 2016). La réaction inflammatoire joue un rôle prépondérant dans le déroulement de la réponse immunitaire. L'inflammation est un processus physiologique dynamique de défense, constitué par un ensemble de réactions vasculaires, cellulaires et humorales afin d'éliminer l'agent agresseur, les débris cellulaires, réparer les tissus lésés et restaurer l'homéostasie (Zeghal et Sahnoun, 2013). Une réaction inflammatoire se manifeste par des symptômes tels que la rougeur, la chaleur, la douleur et une tuméfaction de la partie infectée. Cependant, lorsqu'elle persiste, elle peut engendrer de multiples effets biologiques et cliniques généraux (altération de l'état général, associant une asthénie, une anorexie, un amaigrissement, une fièvre, des troubles du sommeil et une cachexie avec fonte musculaire) (Chen *et al.*, 2018).

I.4.2. Typologie de l'inflammation

I.4.2.1. Inflammation aigüe

Elle constitue la réponse primaire de l'organisme suite à une lésion ou une infection. Elle est immédiate, se déroule en un laps de temps et se caractérise par une augmentation du débit sanguin (circulation accrue de plasma, des leucocytes et des protéines sériques) au niveau des sites infectés. L'inflammation aigüe ne présente aucun danger dans les conditions normales ; cependant si son effet est significatif, des séquelles peuvent subsister (Haioun et Zohra, 2015). Elle se déroule en trois phases notamment la phase vasculaire, la phase cellulaire et la phase de résolution.

➤ La phase vasculaire

Elle se traduit cliniquement par les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aigüe : rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur. Cette phase se déroule principalement en trois étapes : une congestion active, un œdème inflammatoire (l'exsudat) et une diapédèse leucocytaire.

✓ Congestion active

Les cellules résidentes reconnaissent l'agent étranger grâce à des récepteurs présents à sa surface. Sous l'action du système nerveux sympathique et de médiateurs chimiques, il y a une vasodilatation artériolaire et de type réflexe qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction dans la zone atteinte. Il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire. Les vaisseaux de petit diamètre sont dilatés et gorgés d'hématies, bordés d'un endothélium turgescent (Hajjaj, 2017).

✓ Œdème inflammatoire

Il s'agit du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat constitué d'eau et de protéines plasmatiques. Cliniquement, il se traduit par un gonflement des tissus qui compriment les terminaisons nerveuses et provoque la douleur. Sa traduction microscopique est un aspect pâle, peu colorable et distendu du tissu conjonctif. L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout à une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, comme l'histamine. La formation des œdèmes a pour conséquence la limitation du foyer inflammatoire par une barrière de fibrine (provenant du fibrinogène plasmatique), ce qui évite la diffusion de micro-organismes infectieux mais aussi le ralentissement du courant circulatoire par hémococoncentration (Haioun et Zohra, 2015).

✓ **Diapédèse leucocytaire**

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les polynucléaires de type neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur le site inflammatoire (pendant les 6 à 24 premières heures) ; puis elles sont progressivement remplacées par les monocytes et les lymphocytes (24-48 heures). Elle débute par une vasoconstriction de courte durée sous l'action du système sympathique. La sensation de douleur ressentie s'explique par la libération de médiateurs chimiques tels que l'histamine, la sérotonine, les kinines et l'excitabilité des terminaisons nerveuses (nerfs vasomoteurs). La vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation des vaisseaux ce qui entraîne une augmentation de la viscosité et de l'élévation de la perméabilité vasculaire, facilitant ainsi l'afflux des cellules dans le foyer inflammatoire. Les neutrophiles adhèrent aux cellules endothéliales et traversent la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants tels que l'interleukine IL-8 (Hajjaj, 2017).

➤ **La phase cellulaire**

Les modifications vasculaires permettent la migration des leucocytes hors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel déclenchant ainsi la phase cellulaire (Hajjaj, 2017). Elle se caractérise par la formation du granulome inflammatoire ou tissu de granulation inflammatoire constitué des cellules provenant :

✓ Du sang (polynucléaires, monocytes et lymphocytes) : Après diapédèse, ces cellules quittent le territoire périvasculaire et migrent vers le foyer lésionnel par chimiotactisme. Les agents chimiotactiques produits par les tissus altérés, par des bactéries et par les leucocytes déjà présents dans le foyer inflammatoire (leucotriène B₄, interleukine-8, C5a...) se fixent sur des récepteurs membranaires des leucocytes conduisant à l'activation du cytosquelette et à la mobilisation des leucocytes.

✓ Du tissu conjonctif local (fibroblastes, cellules endothéliales, mastocytes et macrophages résidents). Ces cellules vont se multiplier et se différencier sous l'action des facteurs de croissance (Mebirouk, 2017).

La formation du granulome inflammatoire favorise entre autres : le développement d'une réaction immunitaire lymphocytaire B et/ou T, la sécrétion de multiples médiateurs intervenant dans le recrutement cellulaire, la phagocytose, la défense immunitaire, et la modification de la matrice conjonctive.

➤ **La phase de résolution**

Cette phase consiste en l'élimination du pathogène, des neutrophiles morts et des produits de la dégradation tissulaire. Sa durée varie en fonction du degré de lésions tissulaires. Les

macrophages vont alors sécréter des cytokines (IL-4 et IL-10), des fibroblastes et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. (Mebirouk, 2017). Le retour à l'homéostasie est d'abord assuré par la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales grâce à leur capacité à produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine). En cas de lésions majeures (tissu détruit), les macrophages vont participer à l'angiogenèse, les fibrocytes puis les fibroblastes vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus.

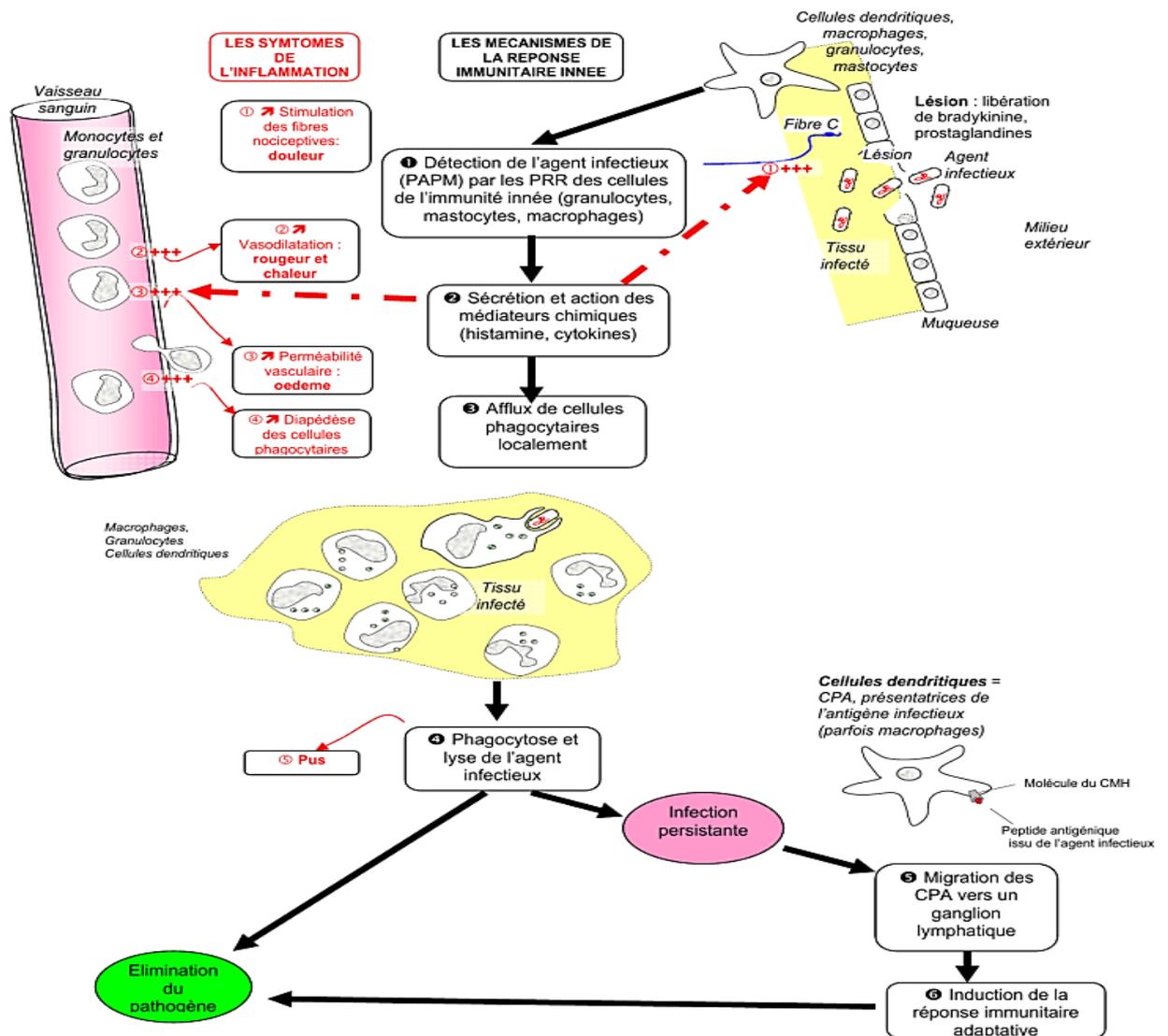


Figure 7 : Inflammation aiguë (Prin *et al.*, 2009).

I.2.2.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique prend place suite à un dommage ou une infection sévère due à la persistance des facteurs d'agression. Elle peut survenir suite à l'échec de la réponse inflammatoire aigüe ou d'une réponse inappropriée (Hajjaj, 2017). Ses caractéristiques principales sont la formation d'un inflammasome (recrutement massif des cellules immunitaires et autres médiateurs inflammatoires au site de l'infection), la prolifération des vaisseaux sanguins et des tissus nécrosants. Ce phénomène est essentiellement dû au déséquilibre entre les molécules pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, et TNF- α) et anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-13 et TGF- β) fortement impliquées dans l'apparition de nombreuses pathologies (Mebirouk, 2017).

I.4.3. Les acteurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire implique une diversité d'acteurs ou de médiateurs. Ce sont notamment les cellules et les médiateurs chimiques. Parmi les molécules qui constituent les médiateurs chimiques les plus actives on peut citer : les cytokines, les chimiokines, les protéines du système du complément, l'oxyde nitrique, les médiateurs lipidiques et les espèces réactives oxygénées (ERO).

I.2.3.1. Les cellules inflammatoires

Les cellules qui interviennent dans les mécanismes de l'inflammation sont essentiellement les cellules circulantes et les cellules résidentes. Les cellules circulantes (éosinophiles, basophiles, neutrophiles, monocytes, plaquettes, lymphocytes et plasmocytes) migrent vers le tissu interstitiel tandis que les cellules résidentes (macrophages, histiocytes, mastocytes, cellules endothéliales et fibroblastes) sont permanemment dans des tissus interstitiels (Tableau II).

Tableau II : Quelques cellules immunitaires, caractéristiques, rôles et médiateurs libérés.

Cellules	Caractéristiques	Rôles	Médiateurs chimiques secrétés
Mastocytes	- Cellules tissulaires de 10 à 20 μm , mononuclées. - Cytoplasme contenant des granules sécrétoires de tailles variables.	Impliquées dans la réaction inflammatoire, les défenses antimicrobiennes et dans les manifestations allergiques.	TNF- α , l'histamine, la sérotonine, PAF, PG, LT.
Lymphocytes	Cellules de l'immunité spécifique humorale et cellulaire de type B et T ou <i>Natural killers</i> (NK).	- type T/CD3+ secrètent les cytokines ; - type B/CD20+ secrètent les anticorps - type NK éliminent les cellules cibles et modulent la réponse immunitaire	- Cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- γ , TNF- α). - Cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10).
Cellules endothéliales	Cellules de l'épithélium formant des vaisseaux à petit et moyen calibre	Elles participent aux phénomènes de réparation post-inflammatoire par la production de protéines matricielles et de différentes protéases.	Oxyde nitrique, endothéline, PG, prostacycline
Macrophages	Cellules volumineuses (20 à 30 μm) d'origine médullaire, issues de la différenciation des monocytes circulants	Elles assurent la phagocytose, la sécrétion des cytokines, la présentation de l'antigène.	IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α .
Granulocytes	Ils possèdent de nombreuses granulations et comportent un noyau polylobé et segmenté	Leur rôle principal est la phagocytose, et peuvent intervenir dans la réponse inflammatoire allergique.	Histamine, Héparine, Sérotonine, LT, PG.

IL: interleukine; **LT:** leucotriènes; **PAF:** "Platelet Activating Factor"; **PG:** Prostaglandine; **TNF- α :** "Tumor Necrosis Factor".

I.2.3.2. Médiateurs chimiques de l'inflammation

Les médiateurs inflammatoires peuvent être d'origine exogène (endotoxines bactériennes comme le lipopolysaccharide [LPS]) ou endogène d'origine cellulaire (prostaglandines, leucotriènes, histamine, facteur d'activation des plaquettes, cytokines, radicaux libres, oxyde nitrique) ou d'origine plasmatique (produits des systèmes du complément, de la coagulation et kinines) (Rankin, 2004).

➤ Cytokines

Étymologiquement le mot cytokine provient de deux mots grecs « cyto » qui désigne la cellule et « kinos » le mouvement. Ce sont des molécules protéiques de faible poids moléculaires (8 à 50 kDas) appartenant à la famille des messagers solubles. Elles sont produites par plusieurs cellules du système immunitaire principalement par les macrophages (monokines), les mastocytes et les lymphocytes (lymphokines) en réponse à divers stimuli. Les cytokines sont des médiateurs de la communication cellulaire qui possèdent une activité pléiotropique à faible dose de manière autocrine ou paracrine. Grâce à leur fixation à des récepteurs membranaires de haute affinité, elles jouent plusieurs rôles dans la réponse inflammatoire, notamment l'activation de l'endothélium et des leucocytes, l'induction de la réponse en phase aiguë et la stimulation des terminaisons nerveuses tissulaires pour informer le système nerveux de l'évolution de l'inflammation (Patel *et al.*, 2017). En fonction de leurs rôles et de la nature de leurs cibles, il existe des cytokines pro-inflammatoires qui amplifient et entretiennent l'inflammation. Il s'agit par exemple de l'IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , des facteurs de croissance comme EGF, G-CSF et les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th17 : IL-17 et IL-22 (Mao *et al.*, 2018). Certaines cytokines sont impliquées dans l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires s'opposant ainsi à leurs effets délétères : ce sont des cytokines anti-inflammatoires comme IL-4, IL-10, IL-12, TGF β et IL-1ra "IL-1 receptor antagonist" (Wojdasiewicz *et al.*, 2014).

✓ "Tumor Necrosis Factor alpha" (TNF- α)

Le TNF- α ou cachexine est la première cytokine produite par les cellules activées du système immunitaire (macrophages, mastocytes et lymphocytes T) lors de la réaction inflammatoire. Il est synthétisé sous forme d'un précurseur protéique inactif, ancré dans la membrane plasmique. Son activation se fait par clivage sous l'action de l'enzyme TACE "TNF alpha converting enzyme" de la forme inactive. Cette cytokine agit en se fixant sur deux types de récepteurs : TNF-R1 ou p55 et TNF-R2 ou p75 (Wojdasiewicz *et al.*, 2014). Le TNF-R1 est le plus abondamment exprimé et constitue la principale voie de signalisation permettant la médiation des effets délétères du TNF- α , tandis que le TNF-R2 joue un rôle de protection (Laviolle & Bellissant, 2006). Le TNF- α recrute les globules blancs (neutrophiles, éosinophiles et monocytes) sur le lieu de l'infection en stimulant la production de chimiokines et induisant l'augmentation du flux sanguin, la perméabilité vasculaire et l'expression des molécules d'adhérence (fixation des leucocytes et plaquettes à l'endothélium). Cette cytokine active également le potentiel microbicide des phagocytes ; stimule la synthèse d'IL-1 et d'IL-

6 et possède la plupart des propriétés pro-inflammatoires de l'IL-1 ; de même qu'une activité antitumorale, antivirale et antiparasitaire. La production du TNF- α peut être exacerbée et non contrôlée par l'organisme ; cela cause divers effets chez l'hôte pouvant conduire à des œdèmes généralisés, des dommages tissulaires, des effets cytotoxiques et un choc septique souvent fatal qui se caractérise par une hypotension (Adib-Conquy et Cavaillon, 2012).

✓ **Interféron gamma (IFN- γ)**

L'IFN- γ est un homodimère formé par l'association non covalente de deux sous-unités polypeptidiques de 17 kDas. Lors de la synthèse, après de multiples N-glycosylations, les deux sous-unités se lient de manière antiparallèle, constituant une molécule mature de 50 kDas. La symétrie de l'IFN- γ suggère qu'une seule molécule peut se lier simultanément à deux récepteurs, amplifiant les réponses sous-jacentes. Il est principalement sécrété par des lymphocytes activés tels que les cellules "CD4 T helper de type 1" (Th1) et les cellules T cytotoxiques CD8, les cellules T $\gamma\delta$ et les "Natural Killer" (NK) et dans une moindre mesure, par les cellules B et les cellules présentatrices d'antigènes (APC). Son expression est induite par des mitogènes et des cytokines comme l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18 et l'IFN de type I. L'IFN- γ est une molécule pléiotrope à laquelle sont associés des mécanismes antiprolifératifs, pro-apoptotiques et antitumoraux (Castro *et al.*, 2018).

✓ **"Granulocyte-Colony Stimulating Factor" (G-CSF)**

Le G-CSF est une glycoprotéine sécrétée de 25 kDas, codée par le gène CSF3 dont le rôle majeur est la régulation extracellulaire de l'hématopoïèse et du système immunitaire inné. En effet, le G-CSF influence la survie, la prolifération et la différenciation de toutes les cellules de la lignée des neutrophiles à partir de la cellule souche hématopoïétique. Cette stimulation des fonctions des polynucléaires neutrophiles (PN) accroît leur pouvoir bactéricide par le biais d'une augmentation de la production d'ERO aussi bien par les PN vasculaires que par les PN qui ont déjà migré. Tous les tissus de l'organisme sont capables de produire du G-CSF, mais ne le font généralement qu'après une stimulation de celle de l'IL-1, du LPS, du TNF- α et de l'IL-17. Ces derniers induisent la production de G-CSF par les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules mésenchymateuses apparentées et le stroma de la moelle osseuse (Roberts, 2005).

✓ **Interleukine 10 (IL-10)**

L'IL-10 appartient à une famille de cytokines comprenant : l'IL-10, l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22, l'IL-24 et l'IL-26. Ces cytokines présentent les caractéristiques suivantes : un regroupement de leurs gènes codants, des structures génomiques similaires, des structures protéiques primaires et secondaires similaires et l'utilisation de complexes récepteurs

similaires. Le gène de l'IL-10 (interleukine 10) est localisé sur le chromosome 1 des génomes humain (1q31-32) et murin. Sa structure est hautement conservée et constituée de 5 exons et 4 introns, une caractéristique partagée par la plupart des homologues de l'IL-10. Cette dernière est un homodimère de 37 kDas composé de 2 sous-unités de 178 acides aminés de long. La protéine IL-10 contient 4 résidus de cystéine conservés dans sa séquence protéique mature et forme 6 hélices α (A-F) dans sa structure tertiaire. Les réponses cellulaires à l'IL-10 nécessitent la présence du récepteur de l'IL-10 à la surface des cellules. Le récepteur de l'IL-10 est constitué de deux sous-unités, IL10-R1 (CD210), spécifique au complexe du récepteur de l'IL-10 et IL10-R2 qui fait également partie des complexes de récepteurs d'autres ligands : IL-22, IL-26, IL-28a, IL-28b et IL-29. La production d'IL-10 *in vivo* est assurée par les monocytes, macrophages, différents sous-ensembles de lymphocytes T. Les cellules dendritiques, les lymphocytes B, les cellules NK, les mastocytes, ainsi que les granulocytes neutrophiles et éosinophiles synthétisent aussi l'IL-10. Cette dernière est l'une des plus importantes cytokines anti-inflammatoires et immunosuppressives grâce à ses effets majeurs sur les cellules monocytaires notamment : la présentation de l'antigène, la libération de médiateurs immunitaires et la phagocytose. En effet, l'IL-10 inhibe l'expression du CMH de classe II, molécules de surface cellulaire impliquées dans la présentation des antigènes et la costimulation et la production d'IL-1 β et de TNF- α . Ces fonctions biologiques suggèrent que l'IL-10 pourrait avoir une utilité dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires (Sabat, 2010).

✓ **Interleukine 12 (IL-12)**

La cytokine IL-12 est un hétérodimère constitué d'une chaîne légère de 35 kDas (p35 ou IL-12A) et d'une chaîne lourde de 40 kDas (p40 ou IL-12B). Le gène codant pour la p35 est situé sur le chromosome 3 chez l'homme et sur le chromosome 6 chez la souris. La protéine p35 contient 197 acides aminés et présente une homologie avec d'autres cytokines à chaîne unique (par exemple, IL-6 et G-CSF). Le gène p40 de l'IL-12 se trouve sur le chromosome 5 de l'homme dans la même région que l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF et le gène de la souris se trouve sur le chromosome 11. P40 présente une homologie avec le domaine extracellulaire des membres de la famille des récepteurs des cytokines hématopoïétiques (par exemple IL-6R α). En raison de leur localisation sur des chromosomes différents, l'expression protéique des 02 sous-unités est régulée indépendamment et lorsqu'elles sont coexprimées dans la même cellule, elles forment l'hétérodimère IL-12p70 biologiquement actif. Les deux sous-unités sont liées de manière covalente par un lien disulfure entre la Cys74 de p35 et la Cys177 de p40 pour former l'IL-12p70 active.

L'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire qui facilite la présentation des antigènes tumoraux par la régulation positive des molécules du CMH de classe I et II, ainsi que la génération de réponses immunitaires "T helper" de type I (Th1). Ces effets sont étroitement associés à la capacité de l'IL-12 à induire l'expression de l'IFN- γ . En effet, une induction en aval de cytokines comme l'IFN- γ , en particulier, entraîne la régulation à la hausse des molécules du CMH de classe I et II, de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 "Inter Cellular Adhesion Molecule-1", la production d'oxyde nitrique par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et la production des cytokines supplémentaires telles que Mig "Monokine induced gamma interferon" et IP-10 "IFN- γ induced protein", qui à leur tour, ont des effets anti angiogéniques. Les cellules dendritiques et les phagocytes produisent de l'IL-12 en réponse aux agents pathogènes pendant l'infection. Cette production dépend de mécanismes différentiels de régulation de l'expression des gènes codant pour l'IL-12, des modes d'expression des récepteurs TLR "Toll-like receptor" et de la régulation croisée entre les différents sous-ensembles de cellules dendritiques impliquant des cytokines telles que l'IL-10 et l'IFN de type 1 (Akdis *et al.*, 2011).

➤ **Les chimiokines**

Les chimiokines sont de petites protéines ayant un poids moléculaire compris entre 8 et 12 kDas sécrétées par les cellules, capables d'agir à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Ce sont donc des cytokines chimiotactiques c'est à dire dotées de propriétés chimio-attractantes sur les cellules immunitaires, particulièrement les leucocytes (Roy *et al.*, 2014). Elles possèdent une structure tridimensionnelle commune composée de trois feuillets plissés β et d'une partie carboxy-terminale en hélice α . Les chimiokines exercent leurs effets en se liant à sept protéines G transmembranaires. En plus de leur rôle principal de régulation de la motilité cellulaire, elles peuvent également influencer la survie et la prolifération des cellules. Les chimiokines peuvent être divisées en 04 classes structurelles, définies par l'espacement des deux premiers résidus de cystéine conservés de ces protéines : les CXC-chimiokines, les CC-chimiokines, les C-chimiokines et les CX3C-chimiokines.

✓ **Les CXC-chimiokines ou famille alpha**

Dans cette famille, les résidus cystéine sont séparés par un seul acide aminé. Nous y retrouvons des chimiokines telles que GRO α -, β -, γ "Growth Related Oncogen" ; NAP-2 "Neutrophil Activating Peptide" ; ENA-78 "Epithelial Neutrophil-Activating protein-78" ; IP-10 ; Mig ; SDF-1 "Stromal Cell Derived Factor-1" ; PF-4 "Platelet Factor-4" et IL-8. Cette dernière purifiée à partir des monocytes possède une activité chimiotactique vis-à-vis des neutrophiles mais pas des monocytes.

✓ **CC-chimiokines ou famille bêta**

Les membres de cette famille se distinguent par le fait que les 02 premières cystéines sont immédiatement adjacentes. Les chimiokines les plus importantes et les plus étudiées de cette famille sont les MCP “Monocyte Chemotactic Protein” et l'éotaxine. MCP-1 stimule la migration des monocytes sur le site inflammatoire et il induit l'expression d'intégrines nécessaires au chimiotactisme des cellules NK et les lymphocytes T. Elle intervient également dans le relargage des vésicules d'histamine par les basophiles.

CCL11/éotaxine est une chimiokine spécifique associée au recrutement des éosinophiles dans les sites d'inflammation. L'inactivation du gène de CCL11/éotaxine entraîne une réduction marquée du nombre d'éosinophiles dans les tissus, ce qui est associé à une réduction de l'inflammation allergique dans le système gastro-intestinal, les régions sous-cutanées et les voies respiratoires. L'éotaxine agit sur les cellules par l'intermédiaire de son récepteur couplé aux protéines G et les éosinophiles répondent à la libération du ligand CCR3 en subissant une chimiotaxie, une mobilisation du Ca^{2+} , une dégranulation et une explosion respiratoire. Sa production est assurée par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les lymphocytes T, les macrophages et les éosinophiles sous l'action de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL- α qui stimulent l'expression de l'ARNm dont une portion est traduite en éotaxine dans les fibroblastes dermiques humains (Lacy, 2017).

✓ **C-chimiokines ou famille gamma**

Les membres de cette famille sont la lymphotactine et la SCM-1 β “Single C Motif-1 β ” qui présentent une activité chimiotactique pour les lymphocytes.

✓ **CX3C -chimiokines ou famille delta**

Cette famille est toute récente et ne comporte que la fractalkine (FKN) encore appelée neurotactine. Elle possède à la fois un domaine hydrophile extracellulaire de 77 acides aminés et un domaine hydrophobe de 18 acides aminés qui permet son ancrage dans la membrane plasmique. La FKN est caractérisée par la présence de 3 acides aminés variables, entre les 2 premiers résidus cystéine de l'extrémité N-terminale de ces peptides “chemokine [CX3C motif] ligand 1”. La fractalkine est présente à la surface des cellules endothéliales et de certaines catégories de cellules du cerveau. Le domaine extracellulaire peut être clivé donnant naissance à une chimiokine soluble qui peut attirer les monocytes, les lymphocytes T et les neutrophiles. Sous sa forme membranaire, la FKN assure une adhésion cellulaire forte indépendante des intégrines et des sélectines qui intervient dans la migration des leucocytes, permettant ainsi leur arrêt dans le flux sanguin avant la diapédèse (Bachelier *et al.*, 2013). Sous sa forme soluble, elle possède une activité chimiotactique pour les cellules exprimant

son récepteur (Rc) notamment les neutrophiles, les cellules NK, les monocytes CD14+, les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les cellules dendritiques, les lymphocytes B, les neurones, les cellules microgliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les précurseurs d'ostéoclastes. La FKN participe ainsi au recrutement leucocytaire, à la migration de tous les types cellulaires qui portent son Rc ; favorise aussi la différenciation ostéoclastique (Hoshino *et al.*, 2013).

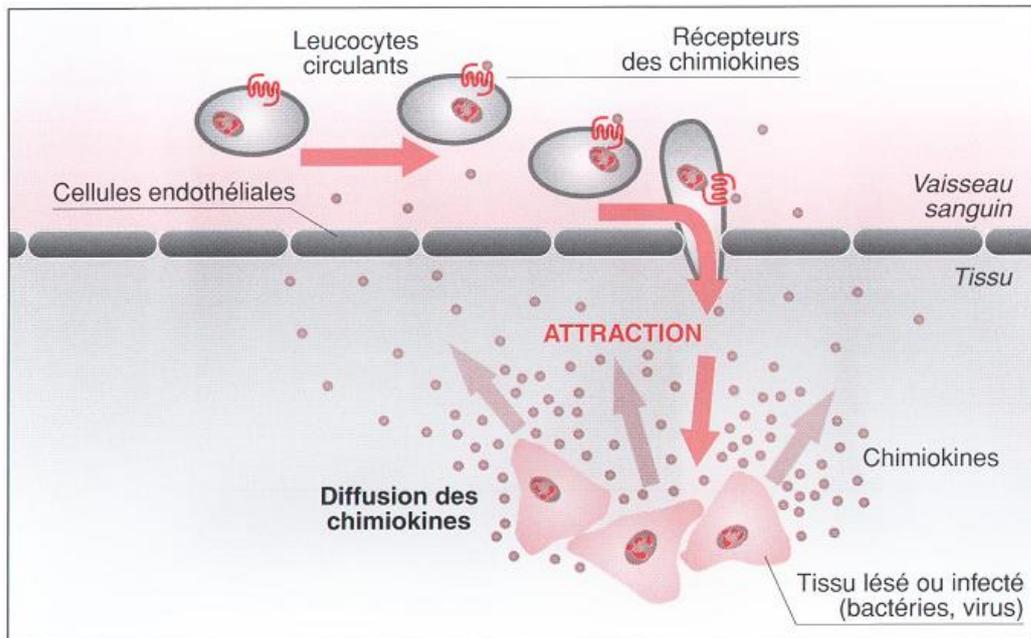


Figure 8 : Schéma du recrutement des leucocytes sur un site inflammatoire (Samson *et al.*, 1999).

I.4.4. Approches thérapeutiques de l'inflammation

Les approches thérapeutiques de l'inflammation sont diverses et dépendent de la pathologie. Cependant, elles consistent majoritairement en l'utilisation des anti-inflammatoires. Ces derniers sont des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogène bloquant ainsi la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (Orliaguet *et al.*, 2013). Elles sont généralement envisagées en cas d'inflammation chronique et entraîne des dommages tissulaires à long terme. Ce sont : les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les anti-inflammatoires naturels, les biothérapies et les immunosuppresseurs.

I.4.4.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes

Les AIS constituent une classe de médicaments qui sont des dérivés synthétiques de la cortisone (méthylprednisolone, le bétaméthasone, la prednisone et la prednisolone doués de propriétés immunomodulatrices et antiallergiques (Danielson *et al.*, 2018). Les glucocorticoïdes agissent par inhibition de la synthèse des prostaglandines qui s'exerce spécifiquement sur la phospholipase A2. En effet, les glucocorticoïdes en se fixant à leur récepteur s'activent et modifient la conformation des protéines chaperonnes dans le cytoplasme. L'ensemble ligand-récepteur migre dans le noyau (translocation nucléaire) pour se fixer sur des séquences d'ADN spécifiques appelées : séquences GRE "*Glucocorticoid Response Element*". Ces dernières sont présentes sur le promoteur des gènes de nombreux médiateurs de la réponse inflammatoire. Les glucocorticoïdes vont soit bloquer l'action du NF- κ B (facteur de transcription des cytokines pro-inflammatoires), l'activation de la prolifération des lymphocytes T et B, l'expression de certaines molécules d'adhésion intervenant dans l'immunité innée ; soit réduire la perméabilité vasculaire empêchant l'afflux des leucocytes au site ou stimuler la transcription de certains gènes (la lipocortine-1, la thymosine...) (Roquilly et Asehnoune, 2019). Toutefois, l'utilisation prolongée et abusive des AIS entraîne des effets indésirables : l'hypertension artérielle, l'hyperglycémie, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'apparition d'ulcères gastroduodénaux, l'ostéoporose, une sensibilité accrue aux infections et des troubles psychiatriques (Mebirouk, 2017).

I.4.4.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

L'usage des AINS est la plus courante dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoire, antalgique, antipyrétique et antiagrégant plaquettaire (Haioun et Zohra, 2015). Il existe plusieurs classes d'AINS notamment les salicylates (Aspirine), les dérivés d'acides propénoïques (Ibuprofène), les dérivés d'acide acétique (Diclofénac), les indoles (indométacine). Leur mécanisme d'action consiste majoritairement en l'inhibition compétitive, réversible ou irréversible, de la COX-1 et/ou COX-2 (Katsinelos *et al.*, 2019). De nombreux effets délétères ont été répertoriés suite à leur utilisation thérapeutique principalement les ulcères gastro-intestinaux, un dysfonctionnement plaquettaire et l'insuffisance rénale (Grandin, 2013).

I.4.4.3. Anti-inflammatoires naturels

La phytothérapie constitue une alternative plausible aux anti-inflammatoires synthétiques pour limiter leurs effets néfastes. Ces composés bioactifs d'origine végétale, marine et fongique sont d'un intérêt particulier de par la pléthore d'activités biologiques et leur très faible innocuité (Dhingra *et al.*, 2018). Leurs cibles pharmacologiques sont généralement la COX-1 et -2, les lipoxygénases (LOX), le NO, la phospholipase A2 (PLA2). Parmi ces molécules nous avons entre autres les acides ganodériques, les triterpénoïdes isolés de *Ganoderma lucidum*, la ciclosporine A isolée du champignon *Tolypocladium inflatum*, la curcumine isolée de *Curcuma Zongu L*, l'oléorésine issue de diverses espèces de *Copuiferu L.* (*Fabaceae*)...

I.4.5. Modèles d'étude des activités anti-inflammatoires

Plusieurs modèles d'études ont été développées pour mettre en évidence les activités anti-inflammatoires des substances. De manière générale, ils consistent en la détermination des médiateurs inflammatoires libérés après induction par différents stimuli (Nile et Park, 2013). Les techniques les plus couramment utilisées sont récapitulées dans le tableau III. Les médicaments anti-inflammatoires tels que le diclofénac, l'acide acétylsalicylique, l'indométacine et l'aspirine sont les plus fréquemment utilisés comme standard dans les études *in vitro* et *in vivo* (Sarveswaran *et al.*, 2017).

Tableau III : Méthodes d'évaluation des activités anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*.

<i>Tests in vitro</i>		
Agent inducteur	Effets	Références
LPS	Augmentation de la production de NO, des radicaux libres et des cytokines pro-inflammatoires.	Sarveswaran <i>et al.</i> , 2017
Chaleur	Hémolyse	
Solution hypotonique		
<i>Tests in vivo</i>		
- Acide arachidonique (Application à la surface de l'oreille), huile de croton (Application locale dans l'oreille)	Inflammation de l'oreille ou patte de rat (induction d'œdème) ; Augmentation des taux de MDA et des marqueurs du stress oxydant	Nile et Park (2013)
- Carraghénine, Formol (Injection dans la patte postérieure)		Sarveswaran <i>et al.</i> , 2017
Acide acétique	Augmentation de la perméabilité vasculaire	
Zymosane : - Injection dans la patte postérieure (arthrite) ; - Injection dans le péritoine (péritonite)	Migration leucocytaire, Augmentation de l'influx cellulaire global, des taux de MPO, GSH, MDA, cytokines inflammatoires.	Falcão <i>et al.</i> , 2019 ; Holanda <i>et al.</i> , 2020

I.4.6. Stress oxydatif, inflammation et cancers

La production excessive des espèces réactives oxygénées (ERO) est souvent liée aux processus de vieillissement et au développement des maladies associées à l'inflammation telles que les cancers (Becker *et al.*, 2013). En effet suite à des processus physiologiques tels que la respiration, le métabolisme, les cellules aérobies produisent l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($HO\bullet$), et les peroxydes organiques comme produits normaux de la réduction biologique de l'oxygène. Dans les conditions d'hypoxie, la chaîne de respiration mitochondriale produit l'oxyde nitrique (NO), susceptible d'induire la peroxydation lipidique et donc de générer d'autres espèces réactives nitrogénées (MDA). Ces dernières provoquent des mutations de l'ADN, l'instabilité du génome initiant et entretenant ainsi la prolifération des cellules (Visconti et Grieco, 2009).

De plus, les ERO peuvent spécifiquement activer certaines voies de signalisation et contribuer au développement de la tumeur à travers la régulation de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la métastase (Storz, 2005). D'autre part, le stress oxydatif peut accroître la production des cytokines et autres médiateurs inflammatoires via différentes cascades de signalisation. Suite à une stimulation d'origine endogène ou exogène, les ERO agissent

comme messagers secondaires activent les facteurs de transcription nucléaire kappa B (NFκB) et activateur de la protéine-1 (AP-1) conduisant ainsi à la transcription de gènes codant pour des cytokines, chimiokines, des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extracellulaire (Elmarakby et Sullivan, 2012). Les cytokines entretiennent leur propre production et peuvent stimuler la synthèse de médiateurs lipidiques et des ERO. Lorsque les défenses antioxydantes sont dépassées ou en cas de déséquilibre en faveur des pro-oxydants, les cellules inflammatoires à l'instar des mastocytes et des leucocytes sont recrutées au site de l'infection. Ce phénomène entraîne une consommation accrue d'oxygène, une accumulation des ERO et par conséquent une augmentation des risques de cancer. Certaines cellules immunitaires comme les polynucléaires neutrophiles à travers des voies oxydatives sont impliquées dans les dommages de l'ADN et l'activation des phénols, les aflatoxines qui sont des pro-carcinogènes (Reuter *et al.*, 2010).

I.5. Cancer

I.5.1. Définition et généralités

Étymologiquement, le mot cancer vient du grec « carcinomo » qui désigne "un crabe dévorant les tissus". Le cancer peut être défini comme une prolifération anarchique des cellules anormales au sein d'un tissu normal de l'organisme conduisant à l'invasion des tissus voisins par une croissance illimitée, l'invasion et la métastase cellulaire (Tagne *et al.*, 2014). La cancérogenèse ou oncogénèse est l'ensemble des étapes aboutissant à la formation d'un cancer. Elle résulte d'une part de l'activation des proto-oncogènes en oncogènes, de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et de l'inactivation des gènes assurant la stabilité du génome (Hanahan et Weinberg, 2011). En effet, lors de la réplication de l'ADN, des erreurs peuvent survenir ; modifiant ainsi la séquence des gènes et la fonction de la cellule. En outre, des facteurs endogènes peuvent altérer la molécule d'ADN et causer des mutations qui peuvent être insidieuses. Cependant, ces mutations peuvent avoir un impact considérable si elles portent sur les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs ou les gènes de réparation de l'ADN (Ayse, 2018).

Les oncogènes (état muté) ou proto-oncogènes (état normal) sont des promoteurs de la prolifération cellulaire. Ils appartiennent majoritairement aux familles Ras, Myc. Ce sont les gènes HER-2 "Human Epidermal Receptor", EGFR "Epidermal Growth Factor Receptor", N-myc, L-myc et PTEN "Phosphatase and Tensin Homolog". Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des inhibiteurs de la prolifération cellulaire. Ce sont principalement la TP53 "Tumor Protein 53" (impliquée dans la majorité des cancers), les gènes Rb (rétinoblastome),

Bim... Les gènes de réparation qui sont capables de détecter et de réparer les lésions à l'ADN. Ce sont principalement les gènes hMSH2 "mutS homolog 2", hMLH1 "mutL homolog 1", BARD1 "BRCA associated ring domain", BRIP "BRCA interacting protein". En effet, la persistance d'une mutation non réparée donne naissance à une cellule initiée, laquelle se divisera pour donner des clones de cellules anormales et cancéreuses par la suite. Les cellules initiées échappent aux gènes suppresseurs de tumeurs et développent une résistance à la destruction immuno-dépendante. Les cellules tumorales acquièrent une capacité proliférative illimitée ; puis un pouvoir invasif. Ces nouvelles propriétés leur confèrent la capacité de traverser les membranes des cellules, infiltrer les vaisseaux sanguins proches et affecter d'autres organes : c'est la métastase. Les cellules tumorales induisent également l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) pour satisfaire leur demande en oxygène à travers l'organisme.

La cancérogenèse se déroule en trois principales étapes : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 9).

➤ **L'initiation** : Elle consiste en une lésion de l'ADN par des agents génotoxiques dits initiateurs tels que : les radiations ionisantes et ultra-violettes, les virus (virus de l'herpès, papilloma virus, virus de l'hépatite), les carcinogènes chimiques et/ou environnementaux (tabac, métaux, les nitrosamines). Ces substances activent les oncogènes et inactivent les anti-oncogènes dans les cellules souches d'où la formation d'une cellule initiée qui se divise anormalement (Baillet *et al.*, 2015).

➤ **La promotion** : Sous l'action des promoteurs tels que les hormones, les facteurs de croissance, les cytokines, les cellules initiées échappent à l'immunité et prolifèrent pour donner une masse semblable au tissu où elles sont logées (Reece *et al.*, 2012).

➤ **La progression** : Les cellules cancéreuses sécrètent des protéases qui vont rompre la membrane basale et digérer les fibres du tissu conjonctif (collagène, fibronectine, laminine) leur permettant de migrer. Elles sécrètent également des facteurs angiogéniques assurant ainsi leur nutrition et leur propagation dans d'autres organes (Baillet *et al.*, 2015).

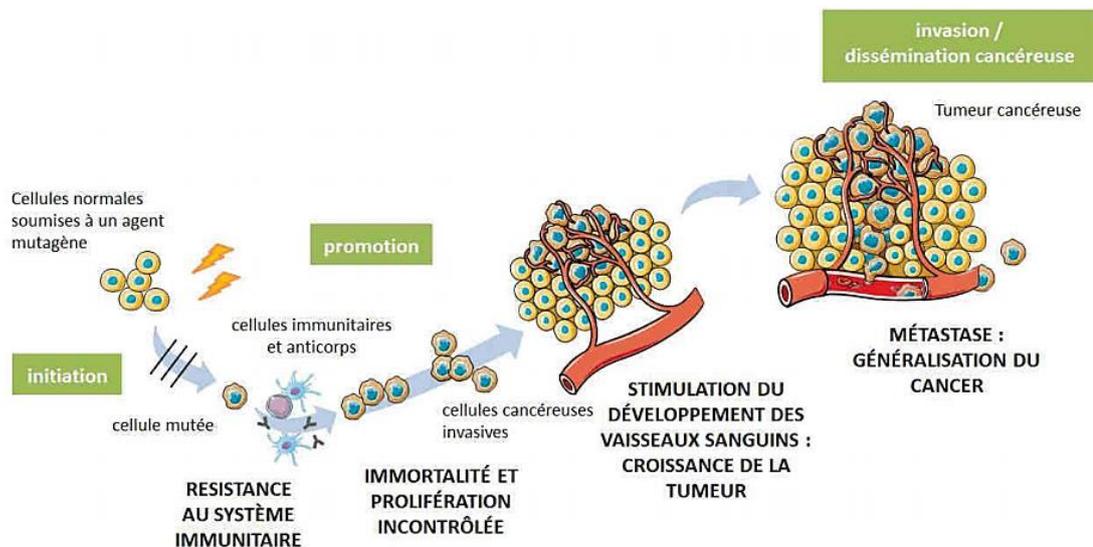


Figure 9 : Etapes de la cancérogenèse. *Source : Cellules de la banque d'images ppt Servier.*

I.3.2. Epidémiologie

Le cancer demeure un problème de santé publique à l'échelle mondiale car il est la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires (soit 13% de tous les décès mondiaux). Chaque année, les cancers sont responsables de plus de 9,6 millions de décès avec 19,3 millions de nouveaux cas et 10 millions de décès enregistrés en 2020 (Hyuna *et al.*, 2021). Son évolution est vertigineuse et selon l'OMS, 15 millions de décès pourraient être enregistrés à l'horizon 2030 avec près de 70% de nouveaux cas détectés dans les pays en développement (Asie, Afrique subsaharienne). A cette date une prévision épidémiologique de 1,2 million de nouveaux cas de cancers avec plus de 970.000 décès est faite pour l'Afrique si des mesures palliatives ne sont pas rapidement mises sur pied (Ferlay *et al.*, 2015). Cette avancée exponentielle du cancer est le fait de l'ignorance de la population, l'incidence des maladies infectieuses, la faiblesse des systèmes de santé, l'inégalité d'accès aux soins résultant d'une pauvreté généralisée. Au Cameroun plus de 20.000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués et plus de 14.000 décès ont été enregistrés en 2020 (GLOBOCAN, 2021).

I.5.3. Typologie des cancers

La diversité des cancers est fonction des causes, des organes affectés, des symptômes et des traitements. Ainsi plus de 200 types de cancers ont été répertoriés à nos jours. Selon le type cellulaire initialement affecté, nous distinguons :

➤ **Les carcinomes** : Lorsque les cellules cancéreuses apparaissent dans un épithélium. C'est le cas des adénocarcinomes qui se développent dans l'épithélium d'une glande ou d'un hépatocarcinome (développement des cellules cancéreuses dans le foie).

➤ **Les sarcomes** : C'est un cancer apparaissant dans un tissu de support comme les os, les graisses ou les muscles.

➤ **Les cancers hématopoïétiques** : Les cellules sanguines ou celles des organes lymphoïdes sont affectées. Exemple : les leucémies et les lymphomes (Institut National du Cancer, 2014).

I.5.4. L'hépatocarcinome

I.5.4.1. Epidémiologie et typologie

Le cancer du foie est le sixième cancer le plus fréquent dans le monde avec 905 677 nouveaux cas de cancer du foie détectés en 2020 et la deuxième cause de mortalité liée au cancer dans le monde soit 830 180 décès. Les taux d'incidence et de mortalité les plus élevés sont observés en Asie de l'Est et en Afrique. Au Cameroun, 1021 nouveaux cas et 955 décès dus au cancer du foie ont été enregistrés en 2020 (GLOBOCAN, 2021). D'après la "Surveillance Epidemiology End Results" (SEER), l'hépatocarcinome (HCC) est le type de cancer qui a le plus augmenté depuis le début des années 2000 et pourrait devenir la troisième cause de décès par cancer d'ici 2030 si cette tendance se poursuit (Llovet *et al.*, 2021).

Plusieurs études basées sur des analyses génomiques, épi-génomiques, histopathologiques et immunologiques ont établi une classification moléculaire et immunologique du CHC. Cette classification repose sur les principaux facteurs et voies moléculaires impliqués ou sur le statut immunitaire de la tumeur (Rebouissou *et al.*, 2020). On distingue les classes suivantes :

➤ **Classe des tumeurs associées à la prolifération** qui représente ~50% des CHC et est globalement enrichie en mutations de "Tumor protein 53" (TP53) et dans les amplifications de FGF19 "Fibroblast Growth Factor-19" ou CCND1 "Cyclin D1" (Chiang *et al.*, 2008). Elle comprend deux sous-classes :

- Le groupe de prolifération des cellules progénitrices (25-30% des CHC) caractérisé par l'activation des voies classiques de prolifération cellulaire (telles que les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR "Phosphatidylinositol-3-kinase/A serin-threonin kinase/mammalian target of rapamycin", la voie RAS-MAPK "Mitogen Activated Protein Kinase" et les cascades de signalisation MET "Mesenchymal epithelial transition factor

receptor" et IGF9 "insulin-like growth factor") et par l'expression de marqueurs de cellules progénitrices (tels que EPCAM "Epithelial Cell Adhesion Molecule" et l' α -foetoprotéine).

- Le groupe de prolifération WNT-TGF β (20 % des cas de CHC) se caractérise par une activation non canonique de Wnt.

➤ **Classe des tumeurs sans prolifération** (50% des cas de CHC) est plus fréquente dans les CHC associés à l'alcool et au virus de l'hépatite C (VHC). Au sein de cette classe, deux sous-groupes distincts ont été délimités : l'un caractérisé par une signalisation Wnt canonique dominante associée à des mutations dans CTNNB1 " β catenin" et le second caractérisé par l'activation de la signalisation de l'IFN- α (Chiang *et al.*, 2008).

La classification du CHC en fonction du statut des cellules immunitaires fournit des informations complémentaires sur la compréhension de la maladie. Ainsi nous avons : les tumeurs immuno-active, immuno-épuisée, immuno-intermédiaire et immuno-exclue.

➤ **Les sous-classes immunitaires active et épuisée** qui se caractérisent par des infiltrats de cellules immunitaires de nature distincte. Les tumeurs CHC immuno-actives (trouvées dans 20% des cas) sont enrichies en infiltrats de cellules T auxiliaires actives (CD4+) et en infiltrats de cellules T cytotoxiques (CD8+) et sont sensibles aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires. A l'inverse, les tumeurs épuisées par le système immunitaire sont dominées par des cellules CD8 + dirigées par le TGF β .

➤ **Les tumeurs exclues du système immunitaire** sont caractérisées par la rareté des cellules CD8+, une augmentation des cellules T régulatrices (T reg) et sont dominées par la signalisation canonique Wnt et d'autres cascades immuno-dissuasives. Les tumeurs exclues du système immunitaire sont résistantes aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (Ruiz de Galarreta *et al.*, 2019).

I.5.4.2. Etiologie de l'hépatocarcinome

Plus de 90% des cas de CHC surviennent dans le cadre d'une maladie hépatique chronique du foie. La cirrhose constitue le facteur de risque le plus élevé de CHC avec une incidence annuelle de CHC de 1-6% (Marrero *et al.*, 2018). Les principaux facteurs de risque de CHC sont les suivants : la consommation chronique d'alcool, le diabète ou la stéatose hépatique non alcoolique (SHNA) liée à l'obésité, et l'infection par les virus à l'hépatite B ou C (VHB ou le VHC). D'autres facteurs de risque moins répandus pour le CHC sont la cirrhose due à une cholangite biliaire primaire, l'hémochromatose et le déficit en α 1-antitrypsine (Navin *et al.*, 2019).

➤ **L'infection par les virus de l'hépatite B, C et D** : L'infection par le VHB représente 60% des cas de CHC en Asie et en Afrique et 20% des cas en Occident. Le VHB est un virus à ADN qui peut s'intégrer dans le génome de l'hôte en induisant une mutagénèse insertionnelle conduisant à l'activation d'oncogènes. Le VHB augmente le risque de CHC même en absence de cirrhose. Contrairement au VHB, le VHC est un virus à ARN qui ne s'intègre pas au génome de l'hôte et par conséquent le risque de CHC est principalement limité aux personnes qui développent une atteinte chronique du foie avec une fibrose de transition. Le VHD est un virus à ARN qui nécessite la présence des antigènes de surface du VHB pour sa réplication et par conséquent, pour son pouvoir infectieux. Le VHD affecte 20 à 40 millions de personnes dans le monde et est associé à une évolution plus sévère du CHC (Puigvehí *et al.*, 2019 ; Llovet *et al.*, 2021).

➤ **L'alcool** : La consommation excessive d'alcool entraîne la cirrhose hépatique et le CHC. La cirrhose liée à l'alcool a une incidence annuelle allant de 1 à 2-3% dans les centres de soins tertiaires et représente environ 15 à 30% des cas de CHC selon la région géographique. La consommation chronique d'alcool peut également augmenter le risque de CHC dû à d'autres facteurs étiologiques.

➤ **La stéatose hépatique non alcoolique (SHNA)** : C'est l'étape précurseur du développement du CHC chez les patients souffrant de diabète ou d'obésité. En raison de la prévalence croissante de l'obésité, la SHNA est devenue la cause la plus fréquente de cirrhose dans la plupart des régions du monde (Kanwal *et al.*, 2018).

➤ **L'âge, le sexe et les facteurs environnementaux** : Plusieurs caractéristiques sociodémographiques ont été associées au CHC en particulier chez les patients atteints de cirrhose. Le vieillissement est un facteur de risque important (personnes âgées de plus de 70 ans) ; le sexe masculin probablement lié à une plus grande exposition chez les hommes ainsi qu'à des différences dans les hormones sexuelles (Bray *et al.*, 2018). Des études épidémiologiques ont également mis en évidence le risque accru de CHC associé au tabagisme, à une exposition aux substances chimiques telles que les nitrosamines. Le diéthylnitrosamine (DEN) est un puissant hépatocarcinogène présent dans la fumée de tabac, les eaux souterraines ayant un niveau élevé de nitrates, le fromage, les frites, les boissons alcoolisées, certains produits cosmétiques, chimiques agricoles et pharmaceutiques (Gupta *et al.*, 2010).

I.5.4.3. Méthodes de détection et prise en charge

Le dépistage du CHC chez les patients se fait généralement à un stade avancé. Les patients présentent alors une masse hépatique identifiée, des douleurs abdominales, une perte de poids ou une aggravation d'un dysfonctionnement du foie (Singal *et al.*, 2020). Plusieurs techniques de dépistage ont été mises sur pied notamment :

➤ **L'imagerie** : Elle consiste en la détection des lésions de diamètre ≥ 1 cm par ultrasonographie. Les patients présentent généralement des taux sériques d' α - fœtoprotéine > 20 ng/mL.

➤ **Analyse histologique** : Elle consiste à effectuer des biopsies et à étudier les modifications du tissu hépatique. Les caractéristiques histologiques du CHC sont une augmentation de la densité des hépatocytes, une invasion stromale, dilatation sinusoidale, une infiltration massive des cellules immunitaires, une accumulation des graisses, un motif pseudo glandulaire (Roskams et Kojiro, 2010).

La prise en charge du CHC dépend du stade de développement de la maladie. Les patients présentant des tumeurs de CHC à un stade précoce sont traités essentiellement par résection, transplantation ou ablation locale. Au stade intermédiaire, la chémoembolisation transartérielle est requise et au stade avancé, les patients recevront des thérapies systémiques.

I.5.5. Chimio-prévention des cancers

La chimio-prévention est une méthode prophylactique qui consiste en l'utilisation des molécules d'origine synthétique ou naturelle sans effet délétère pour empêcher, bloquer l'apparition ou le développement de certaines maladies dont les cancers. Les plantes médicinales font partie intégrante de ce schéma de lutte grâce à leurs multiples composés bioactifs. En effet, il a été clairement démontré que les extraits de plantes médicinales possèdent une activité cytotoxique vis-à-vis des lignées de cellules cancéreuses (Rakhi *et al.*, 2011). Les métabolites secondaires contenus dans ces plantes sont capables d'interagir sur la modulation des signaux mitogènes, de survie cellulaire, d'apoptose, de régulation du cycle cellulaire, d'angiogenèse ou encore sur des processus intervenant dans le développement des métastases (Gaascht, 2013). Parmi ces substances, nous avons les flavonoïdes (carottes), les isothiocyanates (choux), les lycopènes (tomates), les indoles, et les organosulfures etc... Les isoflavones dont les plus répandus sont la génistéine, la daidzéine et la glycitéine retrouvés dans les graines de soja modulent la signalisation des récepteurs d'œstrogènes, possèdent des activités antioxydante et antitumorale en inhibant les voies de signalisation des récepteurs à

tyrosine kinase. L'épigallocatechine-3-gallate, qui est une catéchine abondamment retrouvée dans le thé vert exerce une activité antitumorale en induisant l'hypométhylation du promoteur d'importants gènes suppresseurs de tumeurs, notamment p16, p21, RAR β , RXR α , MGMT et MLH1 ainsi que l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose de différentes lignées de cellules cancéreuses. Le resvératrol est un stilbénoloïde et une phytoalexine produite par plusieurs plantes dont le raisin, les arachides... Ce composé est impliqué dans la diminution de l'expression des facteurs de transcription associés à l'inflammation tels que NF κ B ou la protéine activatrice-1 (AP-1), c-Jun, c-Fos et l'inhibition de la sécrétion de protéines pro-inflammatoires comme la prostaglandine E2. La curcumine, un composé phénolique naturel isolé du curcuma (*Curcuma longa*) possède des activités antitumorales qui sont médiées par l'inhibition de multiples voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération, de l'apoptose, de l'angiogenèse et de l'inflammation. L'azadirachtine, un terpénoïde isolé des graines de Neem (*Azadirachta indica*) est capable d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF κ B, impliqué dans les processus inflammatoires et d'induire la mort des cellules cancéreuses leucémiques K562 (Schumacher *et al.*, 2010 ; Melo *et al.*, 2018). D'autres familles de métabolites à l'instar des polysaccharides sont également exploitées en chimioprévention des cancers. Certains des polysaccharides les plus utilisés dans ce but sont isolés des champignons ; c'est le cas du lentinan, du schizophyllan qui sont des β -glucanes isolés respectivement de *Lentinus edodes* et *Schizophyllum commune*, de la krestine (polysaccharopeptide) isolé de *Trametes versicolor*, du tremellan isolé de *Tremella fuciformis* Berk., du Cordyglucan isolé de *Cordyceps sinensis*, du Ganoderan isolé de *Ganoderma lucidum* (Chakraborty *et al.*, 2021). Les polysaccharides modulent le système immunitaire et exercent indirectement des effets anticancéreux (Liu *et al.*, 2021). Ces propriétés justifient leur exploitation comme palliatifs ou adjuvants aux médicaments de chimiothérapie responsables de l'immunosuppression.

I.5.6. Méthodologie d'étude des activités antitumorales

I.5.6.1. Méthodes *in vitro*

La cytotoxicité est l'un des indicateurs les plus importants pour l'évaluation des activités antitumorales *in vitro*. Les tests de viabilité cellulaire et de cytotoxicité sont basés sur la perméabilité de la membrane cellulaire, l'activité enzymatique, l'adhérence cellulaire, la production d'ATP, la production de coenzymes et l'activité d'absorption de nucléotides. Ces tests peuvent être catégorisés en : essais d'exclusion de colorant, essais colorimétriques [test au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), test au MTS (5-

(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4,5-diméthylthiazole)-3-(4-ulfophényl) tétrazolium), les essais fluorométriques (test au sel de résazurine) et dosages luminométriques. La cytotoxicité d'une substance se manifeste à travers divers mécanismes tels que la destruction des membranes cellulaires, l'inhibition de la synthèse des protéines, la liaison irréversible aux récepteurs, l'inhibition de l'élongation des désoxynucléotides et les réactions enzymatiques (Ishiyama *et al.*, 1996).

I.5.6.2. Méthodes *in vivo*

La nécessité de disposer de modèles animaux expérimentaux de tumeurs hépatiques analogues à ceux de l'homme a constitué un défi pour les chercheurs qui ont tenté plusieurs approches pour élucider le mécanisme de l'hépatocarcinogenèse humaine. Le modèle animal "idéal" doit reproduire la physiopathologie et la biochimie du CHC humain afin de permettre l'évaluation de potentiels nouveaux médicaments dans les essais précliniques et contribuer au développement de la thérapie par cibles moléculaires.

Les modèles d'étude *in vivo* de CHC peuvent être organisés comme suit : les modèles induits par des produits chimiques, modèles d'implantation (modèles de syngénésie et de xénogreffe), modèles viraux, et les modèles de souris génétiquement modifiées (Santos *et al.*, 2017).

➤ **Modèles syngéniques** : Ils comprennent les tumeurs qui sont nées dans la même souche à la suite de causes spontanées d'hépatocarcinogènes, d'infections virales et de souris génétiquement modifiées.

➤ **Modèles induits par des produits chimiques**

Les composés chimiques que l'on retrouve dans les produits alimentaires, de conservation/stockage, les produits agricoles et industriels sont capables d'induire une carcinogenèse après une exposition aiguë, à court ou à long terme, selon la structure chimique, la concentration et l'espèce animale. Les modèles d'induction par des substances chimiques de CHC les plus utilisés sont répertoriés dans le tableau IV.

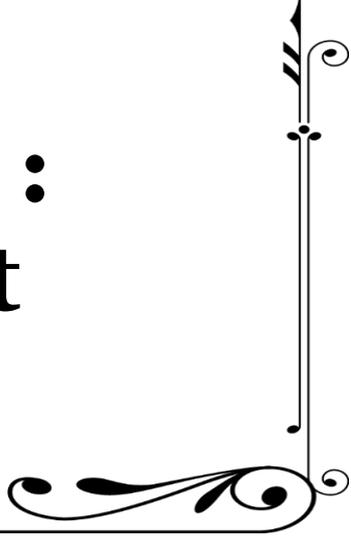
Tableau IV : Modèles d'induction chimique d'hépatocarcinome chez les rongeurs

Carcinogènes	Dose ; âge de l'animal	Voie d'administration	Apparition des tumeurs (Semaines)	Références
DEN	5 mg/kg ; 04 semaines	Intrapéritonéale	12-20	Heindryckx <i>et al.</i> , 2009 ;
	5 mg/kg ; 15 jours		36	Teoh <i>et al.</i> , 2010
DEN + CCl ₄	200 mg/kg + 3 mL/kg	Intrapéritonéale et sous cutanée	24	Kartik <i>et al.</i> , 2010
DEN + PB	100 mg/kg - 05 semaines 0,05% de PB	Intrapéritonéale	20	Sun <i>et al.</i> , 2012
DEN + 2-AAF	200 mg/kg (DEN)- 05 semaines 30 mg/ kg (2-AAF)	Intrapéritonéale et orale	22	Amin <i>et al.</i> , 2011
AFB	6 mg/kg dans 10 µL de DMSO- 04 jours	/	/	Woo <i>et al.</i> , 2011

DEN : Diéthylnitrosamine ; *PB* : Phénobarbital ; *AFB* : Aflatoxine ; *AAF* : 2-acétylaminofluorène.



**Chapitre II :
Matériel et
Méthodes**



II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Les expérimentations décrites dans cette thèse ont été menées à partir des carpophores de *Ganoderma resinaceum*. Ils ont été récoltés en Juillet 2016, dans 03 localités de la région du Centre Cameroun : Mbalmayo (Département du Nyong-et-So'o), Mfou (Département de la Mefou et Afamba) et Yaoundé (Département du Mfoundi). Ces échantillons ont été ensuite identifiés au laboratoire de Mycologie de l'Université de Yaoundé I en comparaison au spécimen DM 764 de la banque de données dudit laboratoire. Les carpophores ont été découpés, séchés à l'air libre jusqu'à obtention d'une masse constante et broyés. La poudre obtenue a été conservée dans un bocal sec hermétiquement fermé et conservé à l'abri de l'humidité pour des études ultérieures (Photo 1).



Photo 1 : Carpophore de *G. resinaceum* sur un tronc de manguiier (Sipping, 2016).

II.1.2. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires cancéreuses du col de l'utérus (Hela), de la glande mammaire (MDA-MB 231) et du foie (HepG₂) ont été utilisées pour l'évaluation de la cytotoxicité des extraits polysaccharidiques. Ces dernières provenaient du "National Centre for Cell Science" (NCCS), Pune en Inde. Elles ont été sélectionnées pour leur haut pouvoir prolifératif/ invasif au niveau des glandes et des tissus conjonctifs (Annexe 1).

II.1.3. Matériel Animal

Des rats mâles sains de souche Wistar âgés de 05-06 semaines et pesant de 70 à 85 g ont été obtenus de l'animalerie du Laboratoire de Biologie et de Physiologie de l'Université de Yaoundé I. Les animaux ont été élevés dans des cages en polypropylène avec des couvercles en maille métallique, puis exposés à température ambiante. Par ailleurs, ces rats ont été

soumis à une alimentation standard (Annexe 2), un abreuvement à l'eau courante et à un cycle lumière/obscurité naturel. La manipulation des animaux s'est faite conformément aux recommandations de la Directive 86/609/CEE relative à la protection des animaux de laboratoire adoptées par le Ministère de la Recherche Scientifique et de l'Innovation du Cameroun (N° : FWA-IRD 0001954).

II.1.4. Matériel de laboratoire

II.1.4.1. Milieux de culture

Quatre milieux de culture ont été utilisés :

➤ Les milieux "Potatoe's Dextrose" Agar (PDA) et Mushroom Complete Medium" (MCM) pour la croissance mycélienne sur milieu solide et la fermentation liquide respectivement ;

➤ Le milieu LB "Lysogeny ou Luria-Bertani Broth" pour déterminer la pureté de l'échantillon ;

➤ Les milieux "L- Roswell Park Memorial Institute" (L-RPMI 1640, Invitrogen, USA) ; Leibovitz L-15 "Thermo scientific" et "Minimum Essential Medium" (MEM) (Invitrogen, USA) pour la culture cellulaire.

II.1.4.2. Réactifs et substances chimiques

Les réactifs pour tests antioxydants, le sérum bovin fœtal, la L-Glutamine et les antibiotiques (streptomycine et pénicilline) ont été fournis par GIBCO (Grand Island, NY, USA). Le Diclofénac de sodium et la κ -carraghénine ont été fournis par Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Germany). Le N-diéthylnitrosamine (CAS 55-18-5) a été obtenu de Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). Le Bleu Trypan (0,4 %), le bromure de [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium ont été fournis par Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

II.1.4.3. Kits et équipements

❖ Kits

Le kit de Chronolab a été utilisé pour le dosage de quelques paramètres biochimiques (ALAT, ASAT, créatinine). Le kit "Rat α FP Alpha-Fetoprotein ELISA kit" (E-EL-R0153, Elabscience, Houston, USA) a été utilisé pour doser le taux d'alpha fœtoprotéine dans le sérum. Le kit multiplex "Rat Cytokine/Chemokine magnetic Bead panel" (EMD Millipore

Corporation, Massassuchets, USA) a été utilisé pour doser les marqueurs de l'inflammation G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p70, éotaxine et fractalkine.

❖ Equipements

Les équipements suivants ont été utilisés : Un agitateur électrique, une centrifugeuse, une étuve, un bain marie, un autoclave, un shaker-incubateur (Excella 24), un lyophilisateur, un spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu, un pléthysmomètre (Ugo Basile, Varese, Italy), un microscope optique Motio BA 210, un agitateur de microplaques (Lab-line, Melrose Park, IL), un appareil LUMINEX (LiquichipM100 QIAGEN, Valencia, CA) et un spectrophotomètre à lecteur de plaque (URIT-66).

II.2. Méthodes

II.2.1. Organigramme de la méthodologie

L'organigramme de la méthodologie est illustré à la figure 10. Ce résumé schématique a été conçu afin d'avoir une vue holistique et une meilleure compréhension de la démarche méthodologique employée. La première partie de ce travail a consisté à une quantification phytochimique de quelques classes de métabolites présents dans les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* suivie d'une évaluation des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo*. Dans la seconde partie, les activités anti-inflammatoires des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont été évaluées *in vitro* et *in vivo* sur un modèle expérimental induit à la κ -carraghénine utilisant les rats mâles de souche Wistar. La troisième partie a consisté à évaluer la cytotoxicité et les effets chimiopréventifs des extraits polysaccharidiques les plus actifs de *G. resinaceum* dans un modèle d'hépatocarcinome induit au diéthylnitrosamine chez les rats mâles de souche Wistar.

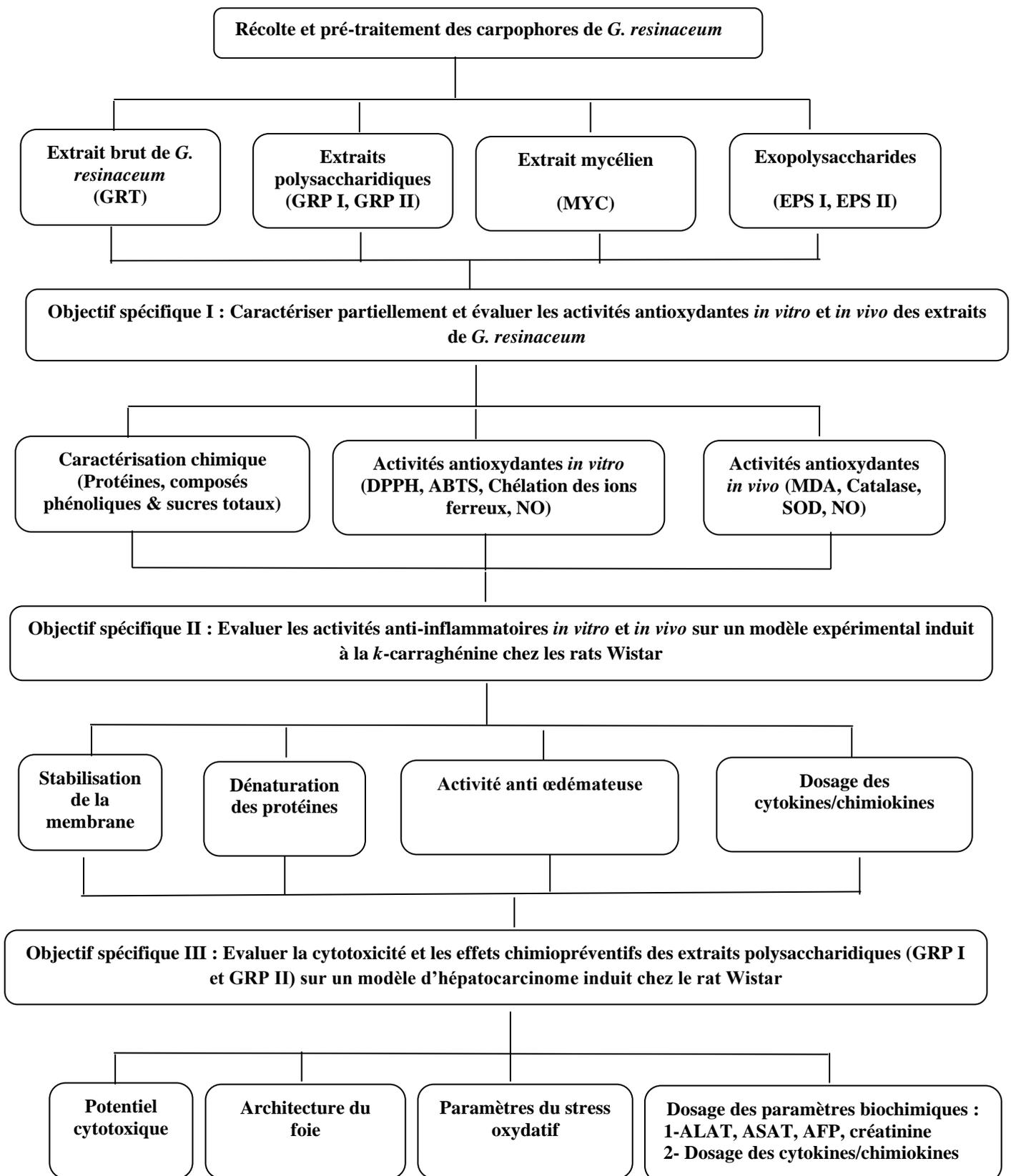


Figure 10 : Organigramme des différentes activités de recherche menées.

II.2.2. Préparation de l'extrait brut des carpophores *Ganoderma resinaceum*

La poudre de *Ganoderma resinaceum* (100 g) a été portée à ébullition dans de l'eau distillée dans les proportions 1:15 (m/v) pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante (TA), le décocté obtenu a été filtré au papier Whatman N°10 et le filtrat obtenu a été lyophilisé pour obtenir l'extrait GRT (Figure 11). GRT a été conservé dans des conditions aseptiques à l'abri de l'humidité pour les expériences ultérieures.

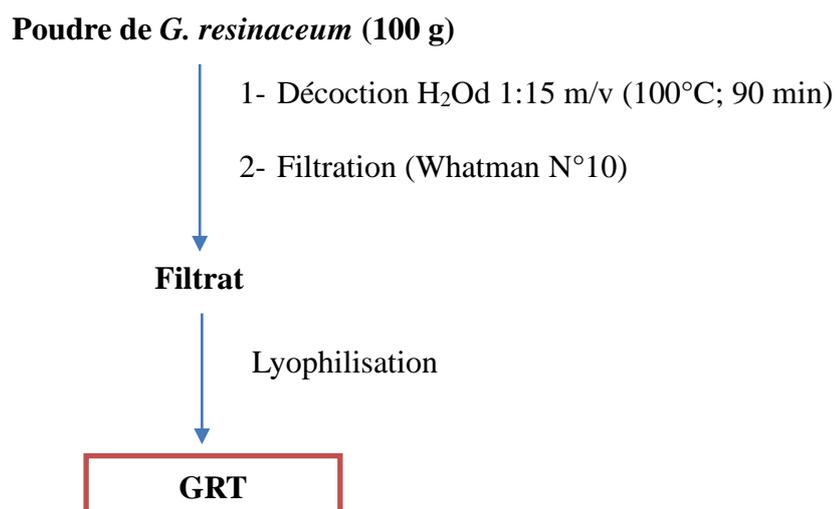


Figure 11 : Protocole de préparation de l'extrait brut des carpophores de *G. resinaceum*.

II.2.3. Préparation des extraits polysaccharidiques

Les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont été préparés selon le protocole modifié de Hua *et al.* (2014). En effet, 500 g de poudre ont été délipidés et dépigmentés par macération dans 6 L de méthanol 50% sous agitation au Shaker pendant 24 h à TA. Ensuite, le mélange a été filtré à l'aide du papier Whatman N°10 et le résidu séché à l'étuve (40°C) pendant 2 h. La poudre obtenue a été portée à ébullition dans de l'eau distillée dans les proportions 1:15 (m/v) à 80°C pendant 2 h. Après refroidissement, le mélange a été filtré à l'aide du papier Whatman N°10 et le filtrat a été précipité par addition successive de l'éthanol aux concentrations 60% et 80%. Les mélanges ont été conservés à 4°C pendant 48 h puis centrifugés (5000 g ; 20 min) à TA. Les culots collectés ont été re-suspendus dans 10 mL d'eau distillée et dialysés contre de l'eau distillée (<14 000 MWCO) pendant 72 h et lyophilisés pour obtenir les extraits GRP I et GRP II. Les différents extraits ont été conservés dans des flacons stériles et opaques à l'abri de l'humidité pour les expérimentations ultérieures (Figure 12). Le rendement d'extraction (Rdt) a été obtenu par la formule :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{M_{\text{lyop}}}{M_{\text{carp}}} \times 100$$

Avec M_{lyop} : masse du lyophilisat (polysaccharides) ;

M_{carp} : masse de poudre de carpophore.

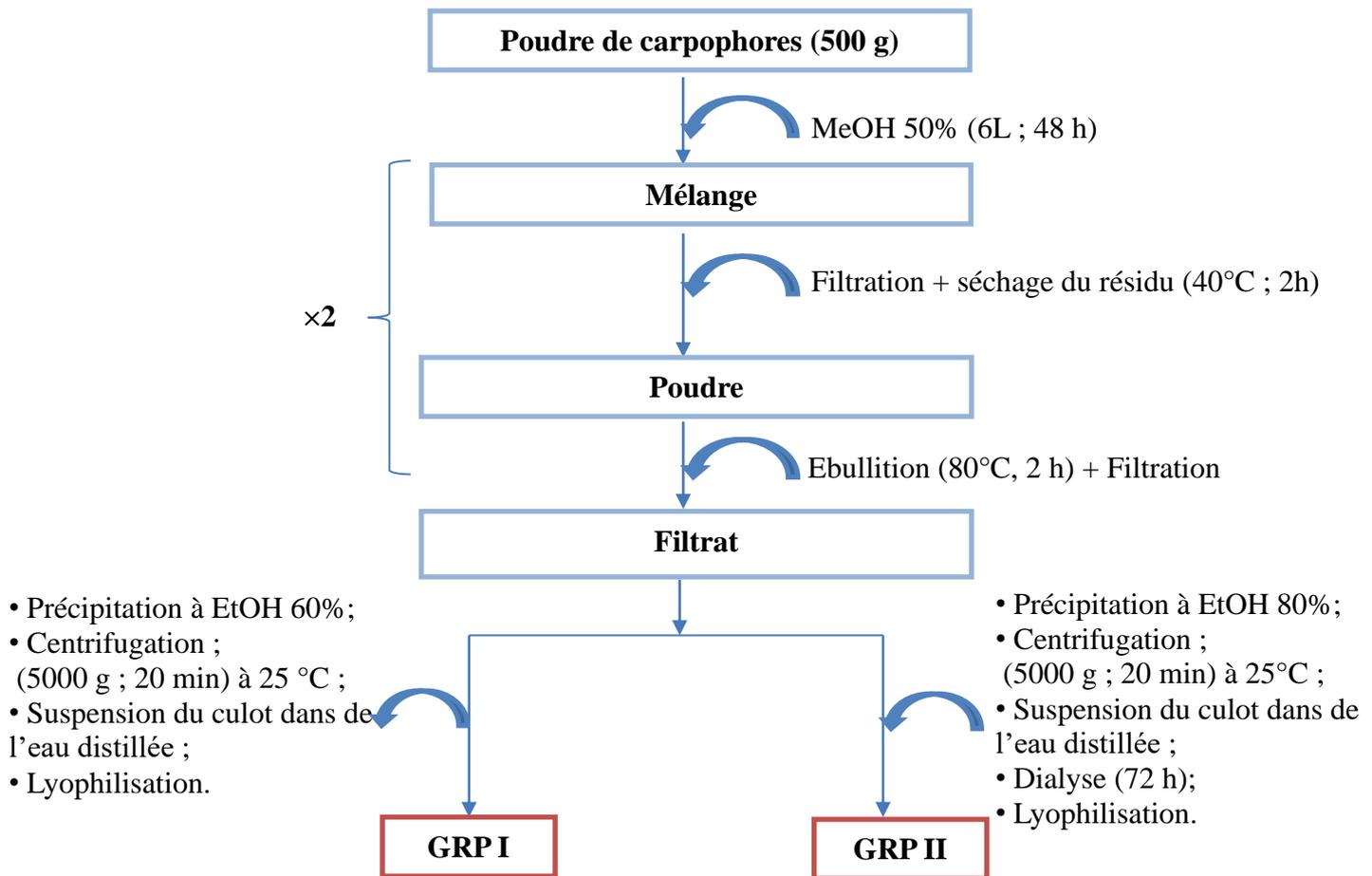


Figure 12 : Protocole de préparation des extraits polysaccharidiques.

II.2.4. Production du mycélium et préparation de l'extrait mycélien de *G. resinaceum*

II.2.4.1. Production du mycélium

Les carpophores de *G. resinaceum* fraîchement récoltés ont été lavés à l'eau courante pour les débarrasser d'impuretés. Puis dans des conditions aseptiques, le basidiocarpe a été stérilisé par trempage à 03 reprises pendant 30 secondes dans une solution constituée d'éthanol 95%, eau oxygénée 3% et d'eau distillée stérile. Ces tissus ont été ensuite rincés par trempage dans de l'eau distillée stérile pendant 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes. Les carpophores stériles ont été aseptiquement découpés à l'aide d'un scalpel stérile et débarrassés de spores. Les fragments de basidiocarpes ont été par la suite prélevés à l'aide d'une pince stérile et déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture "Potatoe's Dextrose Agar" (PDA) préalablement stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min (Annexe 3). Ces boîtes de Pétri ont été ensuite incubées à 27°C pendant 7 jours.

❖ **Mesure du diamètre de croissance radiale et calcul du taux de croissance**

Après purification du mycélium par repiquages successifs sur PDA, des disques d'agar mycéliens de 5 mm de diamètre ont été inoculés dans dix boîtes de Pétri. La croissance mycélienne de *G. resinaceum* a été déterminée par mesure de la croissance radiale sur boîtes de Pétri à intervalle de 48 heures sur une période de 10 jours (Annexe 4). Le taux de croissance (mm/jr) a été calculé par la formule suivante :

$$TC = \{[(\varnothing_{m_{10}}) - (\varnothing_{m_8})] + [(\varnothing_{m_8}) - (\varnothing_{m_6})] + [(\varnothing_{m_6}) - (\varnothing_{m_4})] + [(\varnothing_{m_4}) - (\varnothing_{m_2})]\} \div 4$$

\varnothing_m : Diamètre moyen du mycélium ; TC : taux de croissance en (mm/jr).

❖ **Détermination de la biomasse mycélienne**

Le mycélium aérien issu des boîtes de Pétri (04 disques de 5 mm) a été fermenté dans 250 mL de milieu "Mushroom Complete Medium" (MCM) (Annexe 3) par agitation au shaker (Excella E24) à 150 tr/min à 30°C pendant 04 jours. Le bouillon de culture a été centrifugé à 10 000 g pendant 20 min et le volume de bouillon de culture après centrifugation a été relevé. Le culot récupéré a été suspendu dans de l'eau distillée puis lyophilisé et pesé (Annexe 4). La biomasse mycélienne a été déterminée selon la formule suivante :

$$BM = \frac{M_{myc}}{V_c}$$

Avec **BM**= biomasse mycélienne en g/L ;
V_c= Volume du bouillon de culture en L.

II.2.4.2. Préparation de l'extrait mycélien de *G. resinaceum*

Les disques d'agar mycélien de 5 mm ont étéensemencés sur milieu liquide MCM (Annexe 3) et la fermentation a été réalisée par agitation au shaker (Excella E24) à 150 tr/min à 30°C pendant 04 jours. Le bouillon de culture obtenu a été centrifugé à 10 000 g pendant 20 min et le culot récupéré a été suspendu dans de l'eau distillée et lyophilisé pour obtenir l'extrait mycélien (Figure 13).

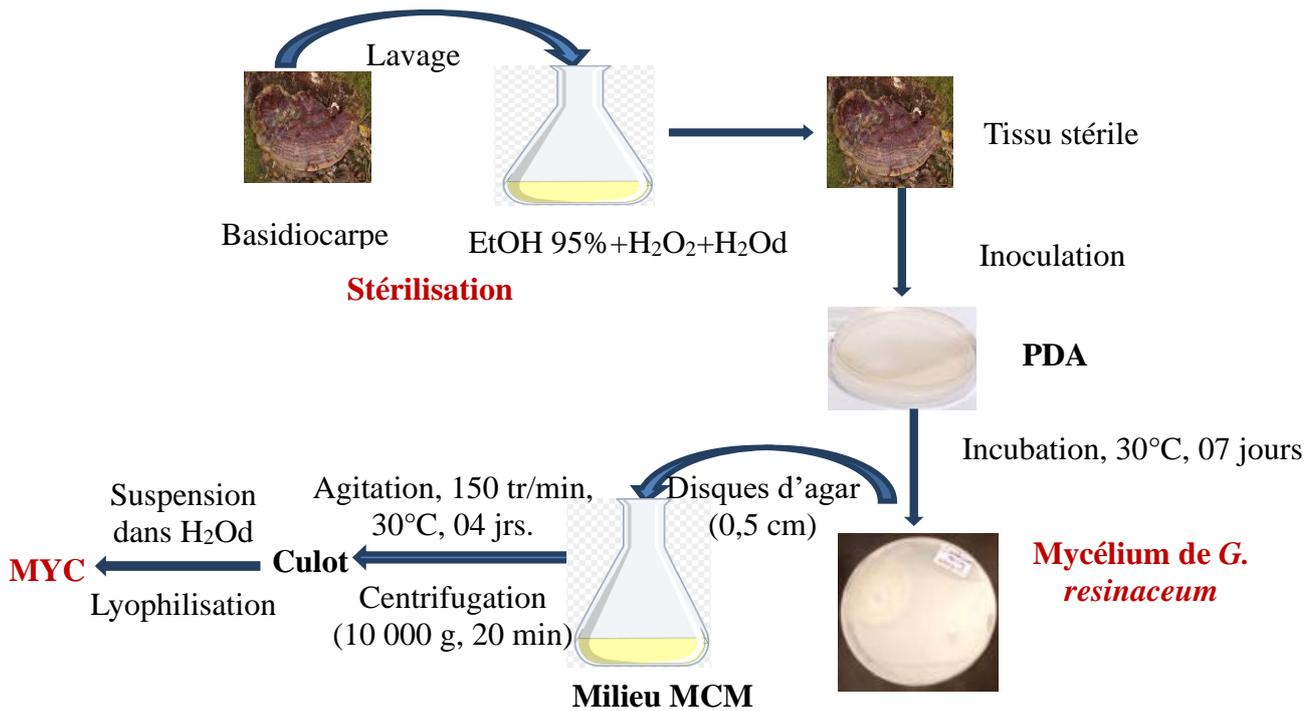


Figure 13 : Protocole de préparation de l'extrait mycélien de *G. resinaceum*.

II.2.5. Production et extraction des exopolysaccharides de *G. resinaceum*

Les exopolysaccharides ou polysaccharides extracellulaires ont été obtenus par fermentation liquide du mycélium aérien de *G. resinaceum*. Cette expérimentation a été effectuée selon le protocole modifié de Kim *et al.* (2006).

II.2.5.1. Production des exopolysaccharides

Les exopolysaccharides de *G. resinaceum* ont été produits par fermentation du mycélium préalablement obtenu sur milieu de culture liquide. En effet, après croissance mycélienne des carreaux de 5×5 mm d'agar ont été prélevés des boîtes de Pétri à l'aide d'un scalpel stérile et introduits dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu MCM à pH 6 (Annexe 3). Les erlenmeyers ne contenant pas de disques mycéliens ont été utilisés comme témoin. La préculture a été obtenue par agitation du mélange à 150 tr/min au shaker (Excella E24) à 25°C pendant 4 jours. Le mélange obtenu a été introduit dans les proportions 4% v/v dans des erlenmeyers de 500 mL contenant le milieu de culture de fermentation (Annexe 3). La fermentation a été effectuée par agitation au shaker (Excella E24) à 150 tr/min, 25°C pendant 14 jours. Des erlenmeyers ne contenant pas de préculture ont été utilisés comme témoin.

II.2.5.3. Extraction des exopolysaccharides

Le bouillon de culture obtenu après 14 jours de fermentation a été centrifugé à 10000 g pendant 20 min à TA. Puis, le surnageant recueilli a été filtré au papier Whatman N°10. Le filtrat a été ensuite précipité successivement à l'éthanol 60% et 80% pendant 48 h à 4°C. Après précipitation, les mélanges ont été séparément centrifugés à 5000 g pendant 15 min à TA. Les culots récupérés ont été ensuite resolubilisés dans de l'eau distillée, dialysés puis lyophilisés pour obtenir les extraits EPS I et EPS II (Figure 14).

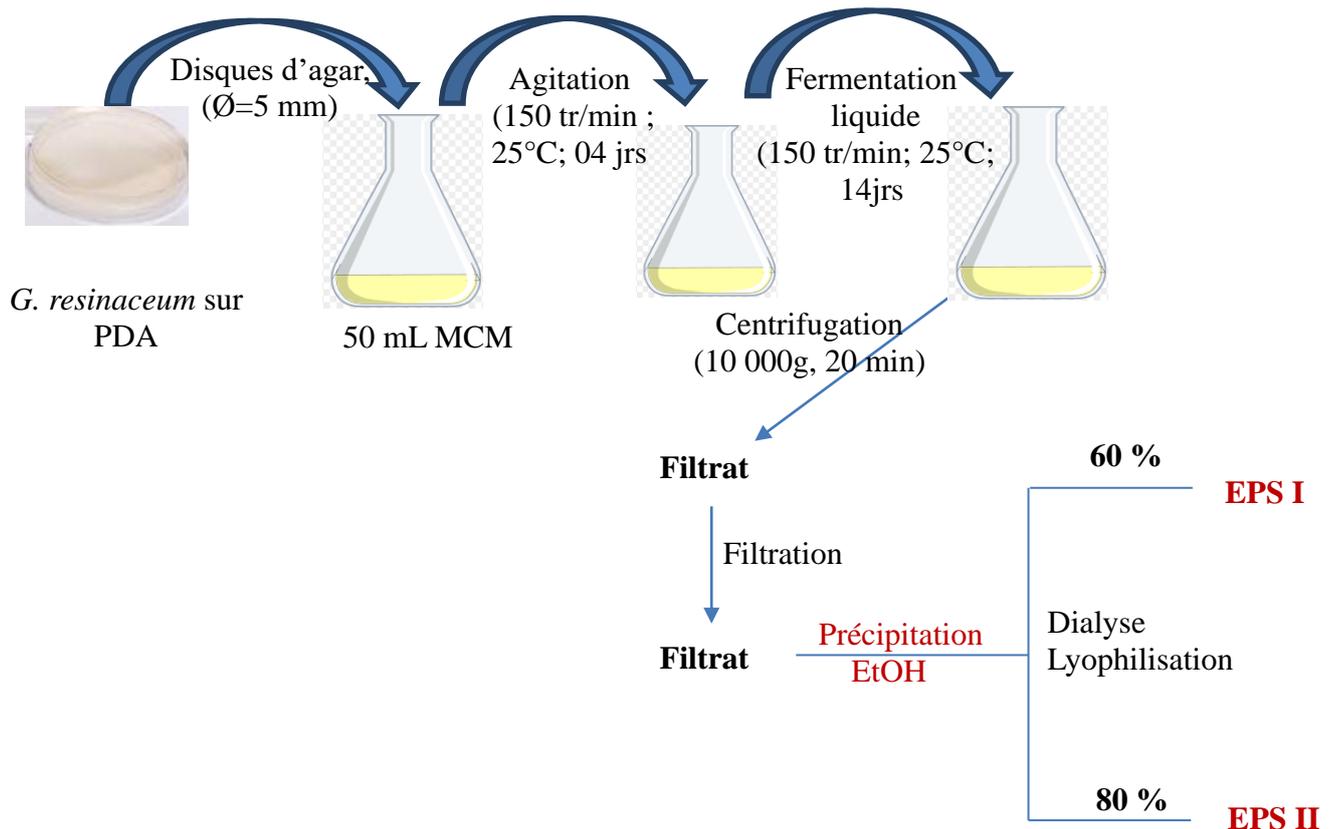


Figure 14 : Protocole d'extraction des exopolysaccharides.

II.2.6. Caractérisation chimique

II.2.6.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique a consisté en la mise en évidence des groupes de métabolites présents dans les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

i) Mise en évidence des saponines

Dans un tube à essai, 15 mL d'eau distillée ont été ajoutés à 2 g d'extrait polysaccharidique de *G. resinaceum*. Le mélange a été ensuite agité vigoureusement pendant 10 secondes au vortex. La présence des saponines a été matérialisée par l'apparition d'une

mousse épaisse d'un centimètre environ qui persistait plus d'une minute après agitation (Harbone, 1976).

ii) Mise en évidence des composés phénoliques

Dans un tube à essai contenant 2 mL d'extrait polysaccharidique de *G. resinaceum* à 10% (m/v), cinq gouttes de chlorure ferrique 3% (Annexe 5.1) ont été ajoutées. La présence d'une coloration bleu-noirâtre a été caractéristique de la présence des polyphénols (Békro *et al.*, 2007).

iii) Mise en évidence des flavonoïdes

À 2 mL d'extrait polysaccharidique de *G. resinaceum* à 10% (m/v), ont été introduits successivement 2 mL d'une solution d'ammoniaque diluée à ½ (Annexe 5.1) et 2 mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'une coloration jaune qui disparaît au fil du temps a caractérisé la présence des flavonoïdes (Harbone, 1976).

iv) Mise en évidence des anthocyanines

Dans un tube contenant 5 mL d'extrait polysaccharidique de *G. resinaceum* à 10% (m/v), 5 gouttes d'ammoniaque diluée 2 fois (Annexe 5.1) ont été ajoutées. L'apparition de la coloration bleue a révélé la présence des anthocyanines (Mamyrbékova-békro *et al.*, 2008).

v) Mise en évidence des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été mis en évidence par la réaction de précipitation avec le réactif de Dragendorff. Dans un tube à essai contenant 3 mL d'extrait polysaccharidique de *G. resinaceum* 10% (m/v), 1 mL d'une solution de HCl 1% (Annexe 5.1) et 5 gouttes du réactif de Meyer ont été ajoutés. Le précipité blanc crémeux formé a été caractéristique des alcaloïdes (Odebeyi et Sofowora, 1978).

vi) Mise en évidence des triterpènes

Dans un tube à essai contenant 10 mL d'une solution d'extrait polysaccharidique de *G. resinaceum* à 10% (m/v), ont été ajoutés 2 mL de chloroforme et le mélange a été homogénéisé ; ensuite 3 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés. La formation d'une interface brun rougeâtre a traduit la présence des triterpènes (Trease et Evans, 1989).

vii) Mise en évidence des tanins

La présence des tanins a été mise en évidence en ajoutant à 2 mL de chaque extrait polysaccharidique de *G. resinaceum* à 10% (m/v), 3 gouttes de réactif de Stiasny constitué de 25 mL de formol 40% et de 25 mL d'acide chlorhydrique 1 N (Annexe 5.1). Le mélange a été

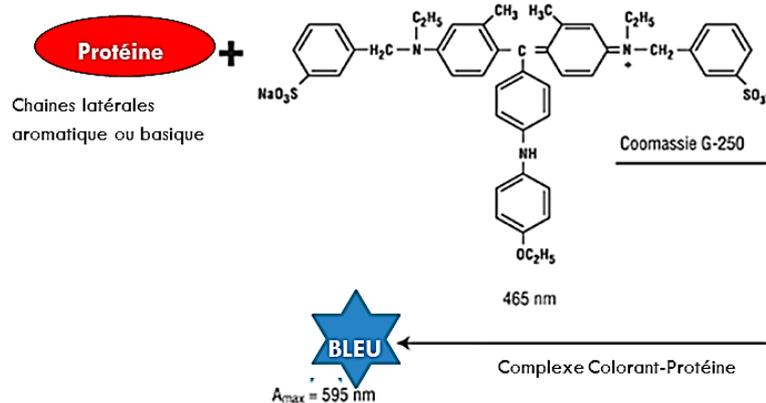
porté au bain marie pendant 15 min. La formation d'un précipité beige a révélé la présence des tanins (Dohou *et al.*, 2003).

II.2.6.2. Détermination de la teneur en protéines

Le dosage des protéines totales a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976), utilisant le Bleu de Coomassie.

➤ Principe

Cette méthode repose sur l'habilité du Bleu Brillant de Coomassie G250 de couleur brun clair en milieu acide, à se fixer sur les résidus hydrophobes des acides aminés constitutifs des protéines. Il se forme un complexe bleu absorbant à un maximum de 595 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans les extraits.



➤ Mode opératoire

Dans les tubes à essai, ont été successivement introduits 1 mL d'extrait de concentration 1 mg/mL et 2 mL de réactif de Bradford fraîchement préparé (Annexe 5.1). La densité optique a été mesurée à 595 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu contre de l'eau distillée (blanc) après agitation au vortex et incubation (30 min ; TA) à l'abri de la lumière. La solution de "Bovine Serum Albumin" (BSA) à gradient de concentrations (0 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100 $\mu\text{g/mL}$) a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage (Annexe 7).

➤ Expression des résultats

La quantité de protéine présente dans les extraits a été exprimée en μg équivalent de BSA par mg de matière sèche ($\mu\text{geqBSA/mg}$).

II.2.6.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques

Le dosage des composés phénoliques a été effectué selon le protocole de Singleton et Rossi (1965) utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

➤ **Principe**

En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, acide fort de couleur jaune formé d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) et d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange bleu d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le milieu dont l'absorption est mesurée à 760 nm.

➤ **Mode opératoire**

Dans un tube à essai, ont été introduits successivement 500 μ L d'extrait de concentration 1 mg/mL ; 650 μ L d'eau distillée et 50 μ L de réactif de Folin 0,2 N (Annexe 5.1). Après incubation pendant 3 min à TA ; 500 μ L de Na_2CO_3 à 20% (m/v) ont été ajoutés au mélange réactionnel. La densité optique a été mesurée à 760 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu contre le blanc après 1 h d'incubation à TA et à l'obscurité. L'acide férulique à gradient de concentration (0 ; 25 ; 50 ; 75 et 100 μ g/mL) a été utilisé pour établir la courbe d'étalonnage (Annexe 7).

➤ **Expression des résultats**

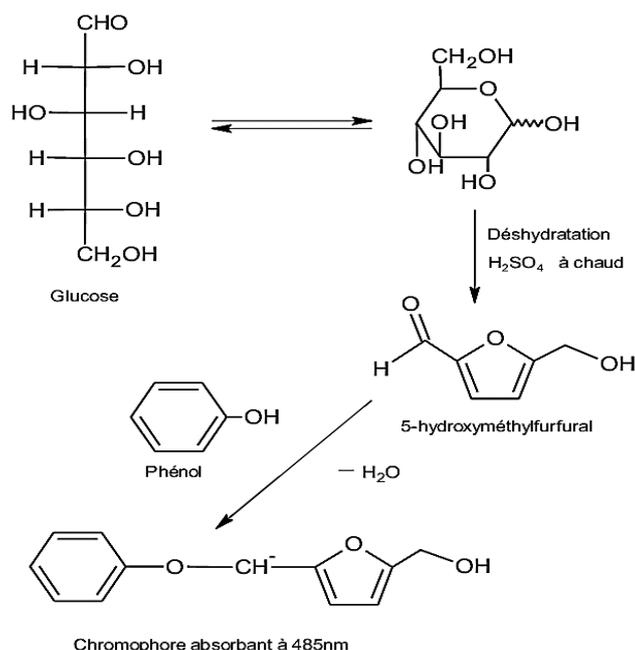
La quantité de composés phénoliques présente dans les extraits a été exprimée en μ g équivalent d'acide férulique (μ gEAF)/mg de matière sèche.

II.2.6.4. Détermination de la teneur en sucres totaux

Le dosage des sucres totaux s'est effectué selon la méthode de Dubois *et al.* (1956).

➤ **Principe**

En présence d'acide sulfurique concentré à chaud, les oses contenus dans les échantillons sont déshydratés et forment des dérivés furfuraliques (hydroxyméthylfurfural ou furfural). Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes orangés dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses présents dans le milieu réactionnel.



➤ Mode opératoire

Dans un tube à essai, ont été respectivement introduits 500 μ L d'extrait de concentration 1 mg/mL, une solution de phénol 5% (500 μ L) suivie de 1000 μ L d'acide sulfurique concentré à 95%. Après agitation, le mélange réactionnel a été incubé pendant 10 min à 100°C à l'obscurité. Le mélange a été ensuite refroidi pendant 30 min à TA pour arrêter la réaction ; le complexe jaune formé s'est stabilisé. La densité optique a été mesurée à 488 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu contre le blanc. La gamme d'étalon de glucose (20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100 μ g/mL) a été utilisée comme référence (Annexe 7).

➤ Expression des résultats

La quantité de sucres totaux a été exprimée en μ g équivalent de glucose (μ gEG) par mg d'extrait sec.

II.2.7. Evaluation des activités antioxydantes

II.2.7.1. Evaluation des activités antioxydantes *in vitro*

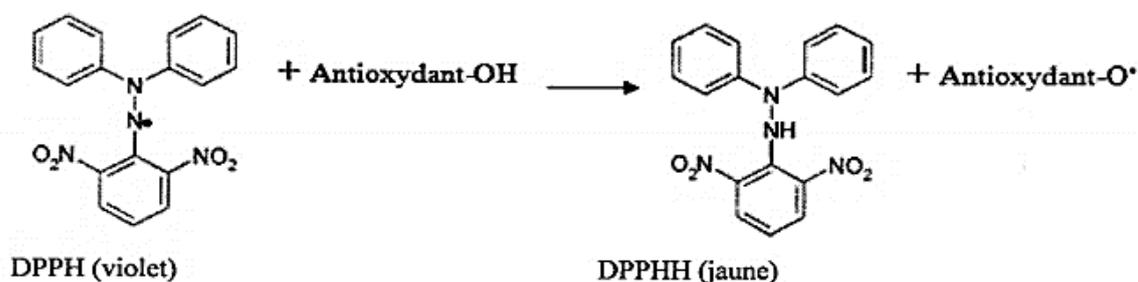
Le pouvoir antioxydant *in vitro* des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* (GRT, GRP I, GRP II, EPS I, EPS II et MYC) a été déterminé par les tests anti-radicalaires DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), ABTS (acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzylthiazoline-6-sulphonique), de réduction du fer, de chélation des ions ferreux et de piégeage de l'oxyde nitrique.

i) Détermination du pouvoir anti-radicalaire DPPH

Le test de piégeage du radical DPPH• est largement utilisé pour étudier le pouvoir antioxydant total des composés isolés ou d'un mélange complexe de diverses plantes. En effet, le DPPH est un radical libre caractérisé par la délocalisation d'un électron sur la molécule empêchant une éventuelle dimérisation. Ce déplacement électronique est corrélé au transfert d'un hydrogène de l'antioxydant au radical DPPH• pour être réduit en DPPH-H (Alam *et al.*, 2013). Dans cette étude, le test anti-radicalaire DPPH a été effectué selon la méthode décrite par Katalinié *et al.* (2004).

➤ Principe

En présence d'antioxydants, le radical DPPH• (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) de couleur violette est réduit par transfert de l'atome d'hydrogène pour former le DPPH-H stable (1,1-diphényl-2-picrylhydrazine), de couleur jaune. Ce changement de coloration se traduit par une décroissance progressive de l'absorbance mesurée à 517 nm. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à l'activité des composés anti-radicalaires de l'échantillon.



➤ Mode opératoire

Dans des tubes à essai, contenant 500 μL d'extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* aux concentrations 25, 50, 100, 150 et 200 $\mu\text{g/mL}$; ont été ajoutés 500 μL d'une solution au méthanol de DPPH 400 μM fraîchement préparée (Annexe 5.2). Le mélange a été vigoureusement agité et incubé à l'obscurité (TA, 30 min) puis l'absorbance a été lue à 517 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu contre le blanc. Le tube témoin contenait 500 μL d'eau distillée et 500 μL de la solution DPPH. L'acide gallique et la catéchine aux concentrations 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 $\mu\text{g/mL}$ ont été utilisés comme .

➤ Expression des résultats

L'activité anti-radicalaire a été exprimée en pourcentage de radical DPPH• réduit calculé comme ci-dessous et sous forme de concentration effectrice 50 (CE_{50}) déterminée par régression linéaire.

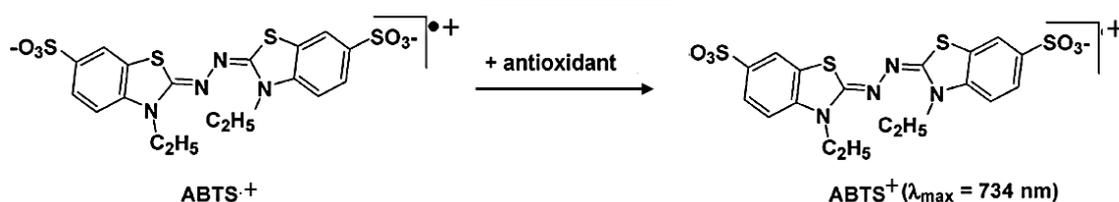
$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [1 - (\text{DO échantillon } 517 / \text{DO contrôle } 517)] \times 100$$

ii) Détermination du pouvoir anti-radicalaire ABTS

Le test de piégeage du radical ABTS est une méthode validée d'évaluation du pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un mélange. Le protocole décrit par Re *et al.* (1999) a été utilisé pour évaluer l'activité anti-radicalaire des extraits polysaccharidiques dans cette étude.

➤ Principe

En présence d'antioxydants donneurs de protons, le radical $ABTS^{\bullet+}$ de couleur verte arrache un proton pour former l' $ABTS^+$. Ce transfert électronique entraîne une décoloration de la solution avec une absorption maximale à 734 nm.



➤ Mode opératoire

Dans différents tubes à essai, ont été introduits successivement 500 µL d'extraits polysaccharidiques de concentrations variables (25 ; 50 ; 100 ; 150 et 200 µg/mL). Ensuite, ont été ajoutés 500 µL du réactif ABTS fraîchement préparé (Annexe 5.2). La lecture de l'absorbance a été effectuée à 734 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu après 30 min d'incubation à TA et à l'obscurité contre de l'eau distillée (blanc). L'acide gallique et la catéchine aux concentrations de 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 µg/mL utilisés comme standards, ont subi le même traitement.

➤ Expression des résultats

L'activité anti-radicalaire a été exprimée en pourcentage de radical DPPH• réduit calculé comme ci-dessous et sous forme de concentration effectrice 50 (CE₅₀) déterminée par régression linéaire.

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = [1 - (\text{DO}_{\text{échantillon 734}} / \text{DO}_{\text{Témoin 734}})] \times 100$$

iii) Evaluation de l'activité chélatrice des ions ferreux

L'habilité des substances à piéger les métaux tels que le fer permet également de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des extraits de plantes et des composés purs. La ferrozine peut réagir avec les ions ferreux pour les chélater formant ainsi un précipité rouge. Cette réaction peut être limitée par la présence d'autres agents chélatants qui réduisent la coloration des complexes ferrozine-Fe²⁺. La mesure de la réduction de l'intensité de la coloration détermine l'activité chélatrice de l'échantillon (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Dans cette étude, le pouvoir chélateur des ions ferreux a été évalué selon le protocole de Dinis *et al.* (1994).

➤ Principe

L'effet chélateur des antioxydants sur les ions ferreux (Fe^{2+}) repose sur la compétition entre l'extrait à analyser et la ferrozine vis-à-vis des ions Fe^{2+} . En effet, lorsque la ferrozine chélate le fer, il se forme un complexe [ferrozine- Fe^{2+}] de coloration bleue absorbant à 562 nm. La décroissance de l'absorbance est proportionnelle au pouvoir chélateur des composantes de l'analyte.

➤ Mode opératoire

Un volume de 500 μ L d'extrait aux concentrations 25 ; 50 ; 100 ; 150 et 200 μ g/mL a été introduit dans différents tubes à essai. Ensuite, 50 μ L de chlorure de fer II ($FeCl_2$), 2 mM (Annexe 5.2) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à TA pendant 1 min. Après incubation, 100 μ L de ferrozine 5 mM (Annexe 5.2) ont été ajoutés dans chaque tube. La solution d'EDTA à gradient de concentration (0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 μ g/mL) a été utilisée comme référence. La densité optique a été déterminée à 562 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu après 30 min d'incubation à TA et à l'obscurité contre le blanc (l'eau distillée).

➤ Expression des résultats

L'activité chélatrice a été exprimée en pourcentage de ferrozine chélatée calculé comme ci-dessous et sous forme de concentration effectrice 50 (CE_{50}) déterminée par régression linéaire.

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [1 - (\text{DO échantillon } 562 / \text{DO contrôle } 562)] \times 100$$

iv) Test du pouvoir réducteur du fer

Ce test permet de mettre en évidence l'habilité d'un extrait ou d'un composé à réduire les métaux tels que le fer. Le protocole modifié de Benzie et Strain. (1999) a été utilisé à cet effet dans cette étude.

➤ Principe

Cette méthode mesure la capacité des antioxydants à réduire les ions ferriques. Elle est basée sur la réduction du complexe de fer ferrique et de chlorure de 2,3,5-triphenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diène (Fe^{3+} -TPTZ) en la forme ferreuse (Fe^{2+} -TPTZ) à faible pH de coloration bleue intense. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'antioxydants présente dans l'échantillon. Cette réduction est suivie en mesurant le changement d'absorption à 593 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à barrettes de diodes.



➤ Mode opératoire

Dans différents tubes à essais, un volume de 100 µL d'extrait polysaccharidique de *G. resinaceum* à la concentration 100 µg/mL a été introduit. Puis, 500 µL de réactif de FRAP (Annexe 5.2) y ont été ajoutés et le mélange a été incubé pendant 30 min à TA et à l'obscurité. L'acide gallique aux concentrations de 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 µg/mL a été utilisé comme standard. Les absorbances ont été lues à 593 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu contre le blanc constitué de l'eau distillée.

➤ Expression des résultats

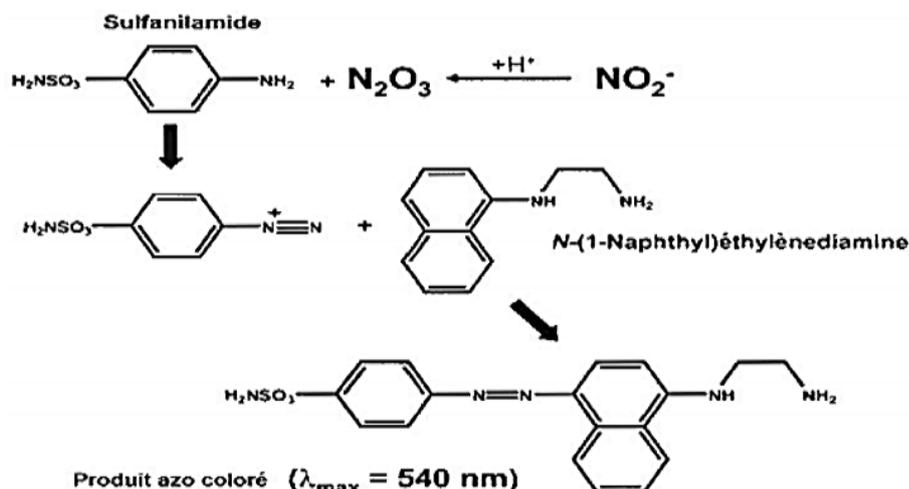
L'activité réductrice du fer a été exprimée en µg équivalent d'acide gallique (µgEAG)/mg d'extrait sec après extrapolation linéaire à partir de la courbe d'étalonnage à base de l'acide gallique (Annexe 7).

v) Test de piégeage de l'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO•) est généré par les tissus biologiques au cours des phénomènes physiologiques sous l'action d'oxyde nitrique synthases. La capacité d'un composé à le piéger lui confère le statut d'antioxydant. En aérobie, ce radical réagit avec l'oxygène pour former des produits stables (nitrates et nitrites). Ces derniers peuvent être quantifiés en utilisant le réactif de Griess (Marcocci *et al.*, 1994).

➤ Principe

Cette méthode repose sur la réaction de Griess. En milieu acide, le nitroprusside de sodium (SNP) subit une diazotation en réagissant avec le dichlorure de N-1- naphthylethylène diamine (NED). Ce système détecte l'ion nitrite formé NO₂• (un des composés primaires stables et non volatiles de la dégradation de l'oxyde nitrique) dans les conditions biologiques (tampon phosphate). Le produit azo ainsi formé est un chromophore stable de coloration pourpre/magenta qui absorbe fortement à 546 nm.



➤ **Mode opératoire**

Dans une série de tubes à essai, ont été introduits 250 µL d'extraits aux concentrations 25 ; 50 ; 100 ; 150 et 200 µg/mL et 1000 µL de nitroprusside de sodium (10 mM). Après incubation à TA pendant 150 minutes, ont été ajoutés au milieu réactionnel 250 µL de réactif de Griess (Annexe 5.2). L'absorbance a été lue immédiatement après à 540 nm au spectrophotomètre UV-VIS 1605 Shimadzu contre le blanc (eau distillée). La solution de nitrite de sodium (NaNO₂) aux concentrations 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 et 100 µg/mL a été utilisée comme référence.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition du radical NO calculé comme ci-dessous et sous forme de concentration effectrice 50 (CE₅₀) déterminée par régression linéaire.

$$\text{Inhibition du radical NO}\cdot (\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec A₀ = absorbance avant la réaction et A₁ = absorbance après la réaction avec le réactif de Griess.

II.2.7.2. Evaluation des activités antioxydantes *in vivo*

L'évaluation des activités antioxydantes *in vivo* a été effectuée sur un modèle expérimental hypergalactosémique des rats mâles de souche Wistar décrit par Aoxue *et al.*, 2011.

i) Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental était constitué de trente-cinq (35) rats mâles de souche Wistar âgés de 05 semaines et pesant en moyenne 70 g. Les rats ont été acclimatés pendant 02 semaines à température ambiante, soumis à un cycle de lumière naturel et nourris régulièrement à base d'une diète normale. Après acclimatation, les rats ont été répartis en cinq lots de sept rats chacun (un groupe normal, un groupe contrôle négatif, un groupe contrôle positif, un groupe GRP I et un groupe GRP II). L'induction du stress oxydatif s'est faite par administration d'une solution de D-galactose à la dose 100 mg/kg par voie intrapéritonéale. La manipulation s'est étendue sur une période de 14 jours allant du jour 1 (prise des premiers paramètres) au jour 14 (jour du sacrifice). La répartition des rats et les différents traitements sont consignés dans le tableau V.

Tableau V : Répartition des rats et traitements.

Groupes	Traitements
Normal (NOR)	NaCl (0,9%) par voie orale ;
Contrôle négatif (CN)	D-Gal (100 mg/kg) + NaCl (0,9%) par voie intrapéritonéale ;
Contrôle Positif (CP)	D-Gal (100 mg/kg) + Vit C (125 mg/kg) par voie intrapéritonéale ;
GRP I	D-Gal (100 mg/kg) + GRP I (125 mg/kg);
GRP II	D-Gal (100 mg/kg) + GRP I (125 mg/kg);

D-Gal : D-galactose ; *Vit C*: Vitamine C ; *GRP I et GRP II* : extraits polysaccharidiques des carpophores de *G. resinaceum*.

Le D-Galactose, l'acide ascorbique (vitamine C), les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II ont été préparés dans une solution saline 0,9% puis administrés par voie intrapéritonéale à l'aide d'une seringue graduée. Les volumes des solutions à administrer ont été calculés en utilisant la formule :

$$V = \frac{D \times P}{CP \times 10^3}$$

V : volume de solution à injecter (mL) ; **D** : dose (mg/kg de poids corporel/jour) ;

P : poids de l'animal (kg) ; **CP** : concentration pondérale (mg/mL).

A la fin de la phase d'expérimentation, les rats ont été mis à jeun pendant 24 h puis, sacrifiés par décapitation cervicale. Le sang a été recueilli dans les tubes EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétate) en vue de la préparation de l'hémolysât. Les organes (foie, cœur, cerveau et reins) ont été prélevés par dissection pour la préparation des homogénats.

➤ **Préparation de l'hémolysât**

Le sang collecté dans les tubes EDTA a été centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min. Le culot recueilli a été lavé dans 2 mL de solution de NaCl (0,9%) et centrifugé (3000 tr/min ; 10 min ; TA). Ces opérations ont été effectuées à 02 reprises. L'hémolyse des érythrocytes a été provoquée par ajout de 2 mL d'eau distillée dans le culot. L'hémolysât obtenu a été recueilli et conservé à -20°C.

➤ **Préparation des homogénats**

Les organes précédemment prélevés par dissection ont été pesés et triturés dans un mortier. L'homogénéisation a été faite dans une solution de NaCl 0,9% (m/v). Les

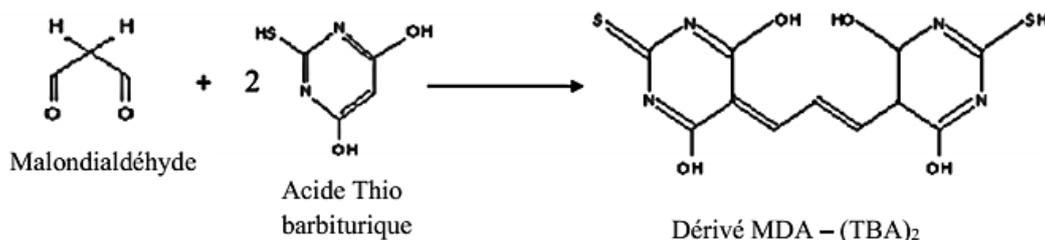
surnageants ont été récupérés dans des tubes Eppendorf après centrifugation des broyats à 3000 tr/min pendant 10 min, puis et conservés à -20°C.

iii) Dosages des marqueurs biochimiques du stress oxydant

❖ Dosage du malondialdéhyde (Yagi, 1976)

➤ Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde (MDA) réagissent en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose ayant un maximum d'absorption à 532 nm.



➤ Mode opératoire

Dans différents tubes à essai, ont été introduits 100 µL d'homogénats et 400 µL de solution de travail (Annexe 5.5). Le mélange a été chauffé au bain marie à 100°C pendant 15 min. Après refroidissement, le mélange a été centrifugé à 1500 tr/min pendant 5 min et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm contre le blanc dépourvu d'échantillon.

La concentration du MDA a été déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Concentration MDA } (\mu\text{M}) = \text{DO}/\epsilon l$$

Avec $\epsilon_{\text{MDA}} = 0,153 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (coefficient d'extinction moléculaire) ; l = longueur de la cuve (1 cm) et DO = densité optique de l'échantillon.

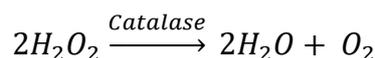
❖ Dosage des protéines totales (Bradford, 1976).

La quantité de protéines totales dans les échantillons (hémolysât et homogénats) a été déterminée selon le protocole modifié de Bradford, 1976 tel que décrit dans la section II.2.6.2.

❖ Mesure de l'activité de la catalase (Sinha, 1972).

➤ Principe

Cette méthode est basée sur l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène sous l'action de la catalase présente dans l'échantillon. L' H_2O_2 resté après action de la catalase se lie au dichromate de potassium en présence d'acide acétique pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable. Ce dernier va ensuite être décomposé par la chaleur et formé un complexe vert qui absorbe à 620 nm.



➤ Mode opératoire

Dans différents tubes à essai, ont été introduits successivement 200 µL de tampon phosphate [0,1 M ; pH = 7,5 (Annexe 5.6)], 100 µL d'échantillon (homogénats) et 200 µL de peroxyde d'hydrogène (0,2 M). La réaction a été arrêtée après 1 min par addition d'un millilitre de dichromate d'acétate constitué de dichromate de potassium à 5% et d'acide acétique dans les proportions 1:3. Les tubes ont ensuite été incubés au bain marie (100°C pendant 10 min). Après refroidissement, l'absorbance a été lue à 620 nm contre le blanc dans lequel l'échantillon a été remplacé par l'eau distillée. Le peroxyde d'hydrogène aux concentrations 0, 4, 8, 16, 32 et 64 µmol/mL a été utilisé comme étalon.

➤ Expression des résultats

L'activité spécifique de la catalase a été exprimée en mmoles de peroxyde d'hydrogène consommée/mn/mg de protéine par extrapolation linéaire à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 7).

❖ Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase (McCord et Fridovich, 1969)

➤ Principe

La méthode repose sur l'inhibition de l'oxydation de l'adrénaline par la superoxyde dismutase (SOD) présente dans l'échantillon en adrénochrome absorbant à 480 nm.

➤ Mode opératoire

Dans différents tubes à essai, ont été introduits 0,2 mL d'échantillon ; 2,5 mL de solution tampon carbonate de sodium (0,05 M ; pH = 10,2) et 0,3 mL d'adrénaline fraîchement préparée dans du tampon carbonate (0,05 M ; pH = 10,2). La variation de la DO du mélange a été lue à 480 nm toutes les 30 secondes pendant 150 secondes. La cuve de référence a été constituée de 2,5 mL de tampon, 0,3 mL d'adrénaline (substrat) et de 0,2 mL d'eau distillée.

➤ Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en unités de SOD/mL. Une unité de SOD est la quantité de SOD nécessaire pour entraîner 50% d'inhibition de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant une minute.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\Delta DO \text{ du blanc} - \Delta DO \text{ de l'échantillon})}{\Delta DO \text{ du blanc}} \times 100$$

$$SOD_{\text{unités/mg prot}} = \frac{SOD_{\text{unités/mg prot}}}{Prot_{(\text{mg/mL})}} \times \text{facteur de dilution}$$

❖ Détermination de la teneur en glutathion réduit

➤ Principe

Le dosage du taux de glutathion réduit (GSH) dans un échantillon repose sur l'habilité du groupement thiol (-SH) du glutathion à réduire le DTNB (acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) en TNB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque) de couleur jaune dont l'absorbance maximale est comprise entre 412 et 415 nm (Ellman, 1959).

➤ Mode opératoire

A 50 µL d'homogénat contenus dans différents tubes à essai, ont été ajoutés 750 µL du réactif d'Ellman. Après agitation des tubes et incubation à TA pendant 60 min, l'absorbance a été lue à 412 nm contre le blanc.

La concentration en glutathion réduit a été déterminée selon la formule suivante :

$$[\text{GSH}] (\text{mol/g}) = \text{DO}/\varepsilon.l.m$$

Avec $\varepsilon = 13600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (coefficient d'extinction moléculaire) ; l = longueur de la cuve (1 cm) ; DO = densité optique de l'échantillon et m = masse de l'organe frais (g).

❖ Détermination de la teneur en oxyde nitrique (NO)

L'évaluation des effets des extraits polysaccharidiques sur le taux d'oxyde nitrique a été effectuée selon la méthode modifiée de Manish *et al.* (2006) dont le principe a été décrit dans la section II.2.7.1.

➤ Mode opératoire

Deux cent microlitres (200 µL) d'échantillon ont été introduits dans des tubes à essais ; puis 200 µL de réactif de Griess ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été incubé à TA pendant 10 min à l'abri de la lumière et les DO ont été lues à 540 nm contre le blanc dépourvu d'échantillon.

➤ Expression des résultats

La teneur en oxyde nitrique dans les échantillons a été exprimée en µM et nmol/g et par extrapolation linéaire à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 7).

II.2.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

II.2.8.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

i) Test de stabilisation de la membrane

La membrane des érythrocytes peut être lysée suite à des dommages induits par la chaleur ou des solutions hypotoniques. La capacité d'un composé à stabiliser la membrane des

globules rouges est un atout pour évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* (Azeem *et al.*, 2010).

❖ Préparation de la suspension des cellules des globules rouges

Le sang veineux a été collecté dans les tubes à héparine après anesthésie et décapitation cervicale de 02 rats mâles de souche Wistar. Après centrifugation (3000 tr/min, 30 min, TA), le culot a été recueilli et lavé à la solution isosaline (Annexe 5.3). Une suspension cellulaire de 10% a été préparée (10 g de culot dans 100 mL de NaCl 0,9%) pour l'analyse ultérieure.

❖ Induction de l'hémolyse

Le mélange réactionnel (4,5 mL) constitué de 2 mL de solution saline hypotonique (0,25% m/v de NaCl), 1 mL de tampon phosphate [0,15 M ; pH 7,4 (Annexe 5.6)], 1 mL d'extrait aux concentrations (100 ; 200 ; 300 ; 400, 500 µg/mL) et de 0,5 mL de la suspension érythrocytaire (10%) a été incubé à 56°C pendant 36 min. Le mélange a été refroidi à l'eau du robinet puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 20 min à TA. L'absorbance du surnageant a été déterminée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu. Dans le tube contrôle, l'extrait a été remplacé par une solution de NaCl 0,9%. L'ibuprofène a été utilisé comme contrôle positif aux concentrations 100 ; 200 ; 300 ; 400 et 500 µg/mL.

➤ Expression des résultats

L'activité anti hémolytique des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* a été évaluée par détermination du pourcentage de stabilisation de la membrane des érythrocytes par la formule suivante :

$$\text{Inhibition de l'hémolyse (\%)} = 100 \times [\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}] / \text{Abs contrôle}$$

ii) Test de dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines est généralement étudiée *in vitro* pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes médicinales et de composés purs. Dans le cadre de cette étude, le protocole modifié de Mehta *et al.*, 2017 a été utilisé.

➤ Mode opératoire

Dans différents tubes à essai, ont été introduits 1 mL d'extrait aux concentrations 100 ; 200 ; 300 ; 400 et 500 µg/mL puis 1 mL de solution d'albumine d'œuf 1 mM (Annexe 5.3). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 15 minutes à TA suivi d'un chauffage à 70°C pendant 05 minutes au bain marie. L'absorbance a été lue après refroidissement à 660 nm au spectrophotomètre UV-1605 Shimadzu contre un blanc constitué d'eau distillée. Le

diclofénac de sodium a été utilisé comme contrôle aux concentrations 100 ; 200 ; 300 ; 400 et 500 µg/mL.

➤ Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé selon la formule ci -après :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [100 - (\text{DO}_{\text{test}} - \text{DO}_{\text{contrôle produit}} / \text{DO}_{\text{contrôle test}})] \times 100$$

II.2.8.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

La *k*-carraghénine est un groupe complexe de polysaccharides, largement exploité sous forme injectable pour induire une inflammation aigüe non immunisée. Ce modèle inflammatoire est très étudié pour sa haute reproductibilité. Dans cette étude, l'effet anti-inflammatoire des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* a été évalué par le test de l'activité anti-œdémateuse induite chez les rats mâles de souche Wistar par injection de la *k*-carraghénine (1%) dans le coussinet plantaire gauche selon le protocole modifié de Sousa et *al.* (2018).

i) Protocole expérimental

Le protocole expérimental a été constitué de trente rats (30) mâles de souche Wistar âgés de 05-06 semaines et ayant un poids compris entre 70 et 85 g. Les animaux ont été acclimatés dans des cages en propylène durant une semaine à TA sous un cycle lumière/obscurité naturel et nourris régulièrement à la diète normale (Annexe 2). Après acclimatation, les animaux ont été répartis en 06 groupes de cinq rats chacun. Un groupe contrôle normal ayant reçu *per os* uniquement la solution saline 0,9% (véhicule) ; un groupe contrôle négatif ayant reçu en plus de la solution saline la solution de *k*-carraghénine 1% (100 µL) par voie intraplantaire ; un groupe contrôle positif ayant reçu *per os* la solution de diclofénac de sodium (20 mg/kg) ; et des groupes tests ayant reçu *per os* les différents extraits (GRP I et GRP II) à la dose de 125 mg/kg. Avant le traitement, les rats ont été mis à jeun pendant 16 heures et le volume initial (V_0) de la patte arrière gauche a été mesuré. L'inflammation a été induite une heure après traitement par injection d'une dose unique de 100 µL d'une solution de *k*-carraghénine 1% dissout dans le NaCl 0,9% dans le coussinet plantaire de la patte arrière gauche chez tous les animaux sauf ceux du groupe normal. L'évolution de l'œdème à la patte arrière gauche a été relevée 1 h, 3 h et 5 h après l'injection à la *k*-carraghénine.

Les mesures de l'évolution du volume de la patte traitée de chaque rat ont été effectuées en triplicata à l'aide d'un pléthysmomètre (Ugo Basile, Varese, Italie). L'activité anti-œdémateuse des extraits et de la substance de référence a été évaluée selon la formule :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(\Delta V_C - \Delta V_T) / \Delta V_C] \times 100$$

Avec V_t : Volume de la patte traitée au temps (t), V_o : Volume de la patte avant l'injection de la carraghénine ; $\Delta V_C = (V_t - V_o)$: la différence moyenne du volume d'augmentation de la patte des rats du groupe contrôle négatif et $\Delta V_T = (V_t - V_o)_T$: représente la différence moyenne du volume d'augmentation de la patte des rats des groupes tests.

A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été anesthésiés avec la combinaison valium/kétamine (10 et 50 mg/kg PC respectivement) puis sacrifiés par décapitation cervicale. Le sang a été collecté dans des tubes secs, centrifugé (600 g, 15 min) à 25°C. Le sérum recueilli a été conservé à -80°C et les homogénats de tissus sous cutanés ont servi pour le dosage des cytokines (G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p70) et des chimiokines (éotaxine et fractalkine) par Luminex. Les pattes des rats ont été décalcifiées à l'acide nitrique 5% et fixés dans le formol 10% pour les analyses histologiques (Figure 15).

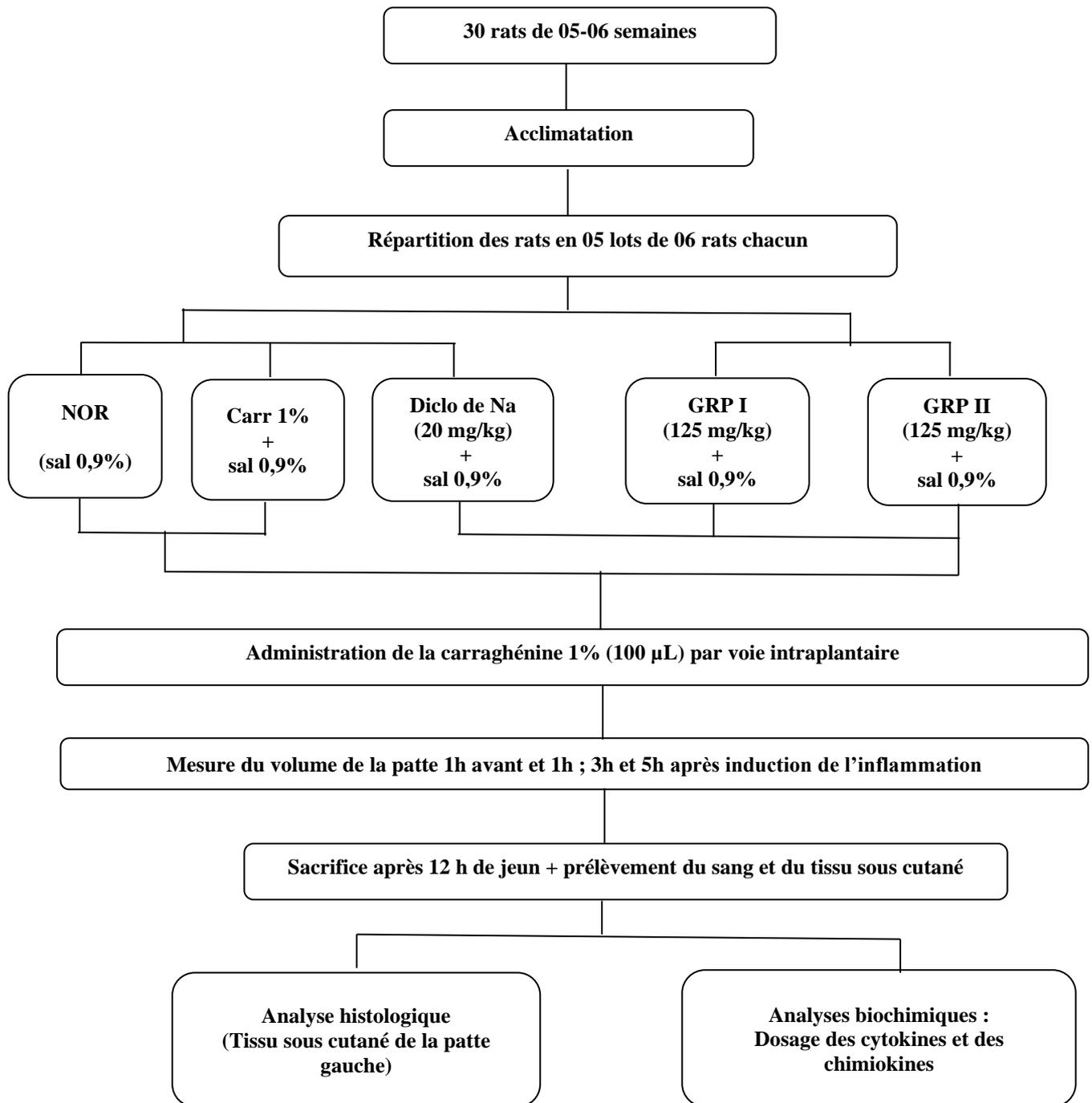


Figure 15 : Protocole de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

NOR : Groupe normal (animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; *Carr* : Groupe contrôle négatif (animaux ayant reçu la solution de carraghénine 1% + solution saline 0,9%) ; *Diclo de Na* : Contrôle positif (animaux ayant reçu la solution de diclofénac de sodium à la dose de 20 mg/kg + la solution de carraghénine 1%) ; *GRP I et GRP II* : Animaux ayant reçu GRP I et GRP II à la dose de 125 mg/kg + la solution de carraghénine 1%).

II.2.9. Evaluation de la cytotoxicité des extraits polysaccharidiques

II.2.9.1. Préparation de l'échantillon

Les échantillons ont été préparés par dissolution de 10 mg de poudre des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) dans 5 mL d'eau distillée stérile. Ces échantillons ont été ensuite déposés dans des plaques contenant le milieu LB "Lysogeny ou Luria-Bertani Broth" (Annexe 3) et incubé à 37°C pendant 18 h pour déterminer leur pureté. L'absence de croissance bactérienne a été indicatrice de la pureté de l'échantillon.

II.2.9.2. Préparation des lignées cellulaires

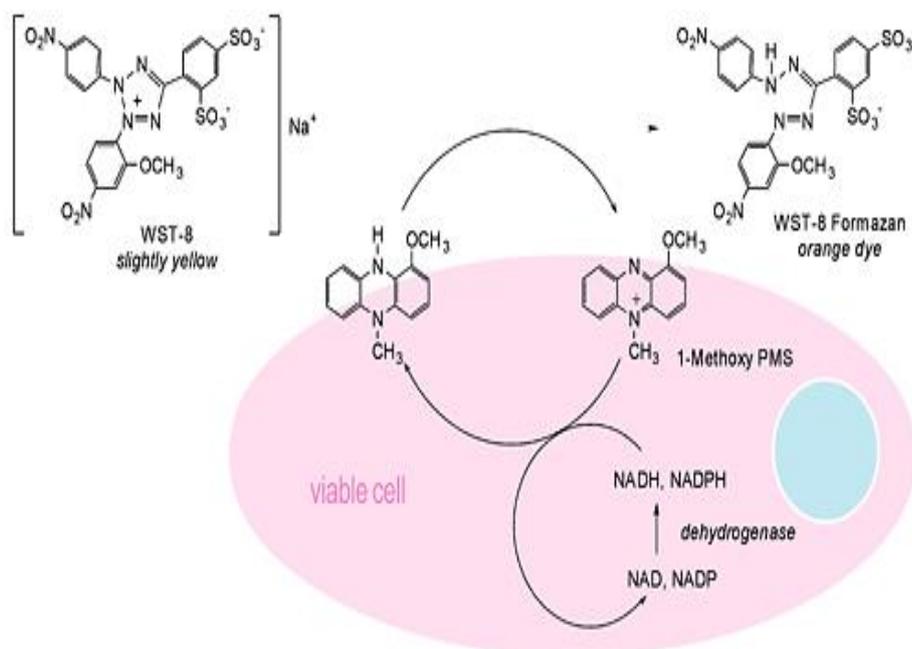
Les lignées cellulaires Hela, MDA-MB 231 et HepG₂ ont été cultivées respectivement dans les milieux LRPMI, L-15 et MEM, tous supplémentés de 10% de sérum bovin foetal, de L-Glutamine (200 mM), streptomycine (200 µg/mL) et de pénicilline (200 U/mL). Ces cultures cellulaires ont été effectuées à 37°C dans un incubateur sous une atmosphère de 5% de CO₂ et 95% d'humidité relative (Annexe 1). Les cellules à 85% de confluence ont été retenues pour l'étude. Le test de viabilité cellulaire a été fait à l'aide du bleu Trypan et la numération des cellules vivantes à l'aide de l'hématocytomètre de Neubauer.

II.2.9.3. Le test au MTT

La cytotoxicité des extraits polysaccharidiques vis-à-vis des lignées cellulaires Hela, MDA-MB 231 et HepG₂ a été évaluée par le test au MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) selon le protocole modifié de Mosmann, 1983.

➤ Principe

Le test au MTT permet de mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale afin d'évaluer l'activité métabolique des cellules en culture. En effet, le cycle tétrazolique du MTT de couleur jaune, est réduit sous l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan de couleur bleu violacé ayant un maximum d'absorption à 590 nm. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules vivantes présentes dans le milieu et par ricochet à leur quantité.



➤ Mode opératoire

Les suspensions cellulaires des lignées Hela, MDA-MB 231 et HepG₂ (Annexe 1) ont été déposées (10³ cellules/100µL/puits) dans une microplaque de 96 puits. La microplaque a été ensuite incubée pendant 24 h dans les milieux et conditions appropriés. Le milieu de culture a été éliminé de chaque puits et les cellules ont été traitées au milieu de culture contenant les extraits polysaccharidiques aux concentrations (125, 250, 500 et 1000 µg/mL). Après incubation pendant 48 h à 37°C et 5% de CO₂, les surnageants de chaque puits ont été remplacés par 20 µL de MTT (0,5 mg/mL dans le PBS 1X stérile) (Sigma life science, USA) suivie d'une incubation supplémentaire de 4 h. Le surnageant a ensuite été débarrassé et le bleu de formazan formé dans les cellules a été dissout en présence de 100 µL de diméthylsulphoxyde (DMSO). La plaque a été incubée ensuite pendant 3 h, et la densité optique a été mesurée à 630 nm au moyen d'un lecteur microplaque ELISA contre le blanc (DMSO). Le témoin a été constitué des cellules exposées au milieu de culture et au DMSO et a été considéré comme correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = 1 - \left[\frac{\text{DO}_{(630 \text{ nm}) \text{ éch}}}{\text{DO}_{(630 \text{ nm}) \text{ contrôle}}} \times 100 \right]$$

II.2.10. Effets protecteurs des extraits polysaccharidiques contre l'hépatocarcinome induit au N-diéthylnitrosamine chez les rats mâles de souche Wistar

Cette étude avait pour objectif d'évaluer la capacité des extraits polysaccharidiques à protéger les organes contre un développement des tumeurs tel que décrit par Cui *et al.*, 2012.

II.2.10.1. Animaux d'expérimentation

Pour réaliser cette étude, soixante-trois (63) rats sains de sexe mâle âgés de 05 semaines et pesant en moyenne 80 g ont été utilisés.

II.2.10.2. Dispositif expérimental

Les animaux ont été acclimatés pendant une semaine. Par la suite, les rats ont été répartis en 07 groupes de 09 rats chacun comme suit. Les groupes normal (NOR) et contrôle négatif (DEN) constitués d'animaux ayant reçu *per os* uniquement la solution saline à 0,9% (véhicule). Le groupe contrôle positif (DOX) constitué des animaux ayant reçu en plus du véhicule par voie intrapéritonéale (*i.p*) la solution référence de doxorubicine à la dose de 10 mg/kg une fois par semaine durant 12 semaines. Les groupes GRP I 125 ; GRP I 250 ; GRP II 125 et GRP II 250 dont les animaux ont reçu respectivement par voie intragastrique les extraits GRP I et GRP II aux doses 125 et 250 mg/kg.

L'induction de l'hépatocarcinome s'est faite par administration par voie intrapéritonéale d'une solution de N-diéthylnitrosamine (DEN) dissoute dans la solution saline (0,9%) à la dose de 100 mg/kg. Cette opération s'est effectuée une fois par semaine durant 10 semaines chez tous les groupes expérimentaux excepté ceux du groupe normal. Une solution de phénobarbital (PB) 0,1% a été également introduite dans l'eau de boisson des animaux durant ces 10 semaines afin de promouvoir l'action du N-diéthylnitrosamine. L'évolution pondérale, les prises alimentaire, hydrique et les modifications comportementales des animaux ont été consignées une fois par semaine durant cette expérimentation. L'administration du phénobarbital à travers l'eau de boisson a été stoppée 03 jours avant la fin de l'étude. Les animaux morts et devenus moribonds au cours de l'expérimentation étaient respectivement autopsiés et sacrifiés afin d'étudier les différents organes vitaux. Les animaux survivants ont été sacrifiés par décapitation cervicale après un jeûne de 12 h sous anesthésie au valium/kétamine (10 et 50 mg/kg PC respectivement). Le sang a été collecté d'une part dans des tubes anticoagulants (EDTA) pour des analyses hématologiques et d'autre part, dans les tubes secs, centrifugé (3000 tr/min, 15 min, TA). Le sérum recueilli a été conservé à 4°C pour des analyses biochimiques. Le cœur, les glandes surrénales, les testicules, les vésicules séminales, l'épididyme, le fémur, le cerveau, la rate, les poumons et le foie ont été prélevés et pesés. Seul le foie prélevé a été fixé dans le formol 10% pour des analyses histologiques. Les homogénats de foie (1%) ont été préparés pour l'évaluation de quelques marqueurs du stress oxydatif et la détermination de la teneur en protéines totales selon le protocole modifié de Bradford, 1976 (Figure 16).

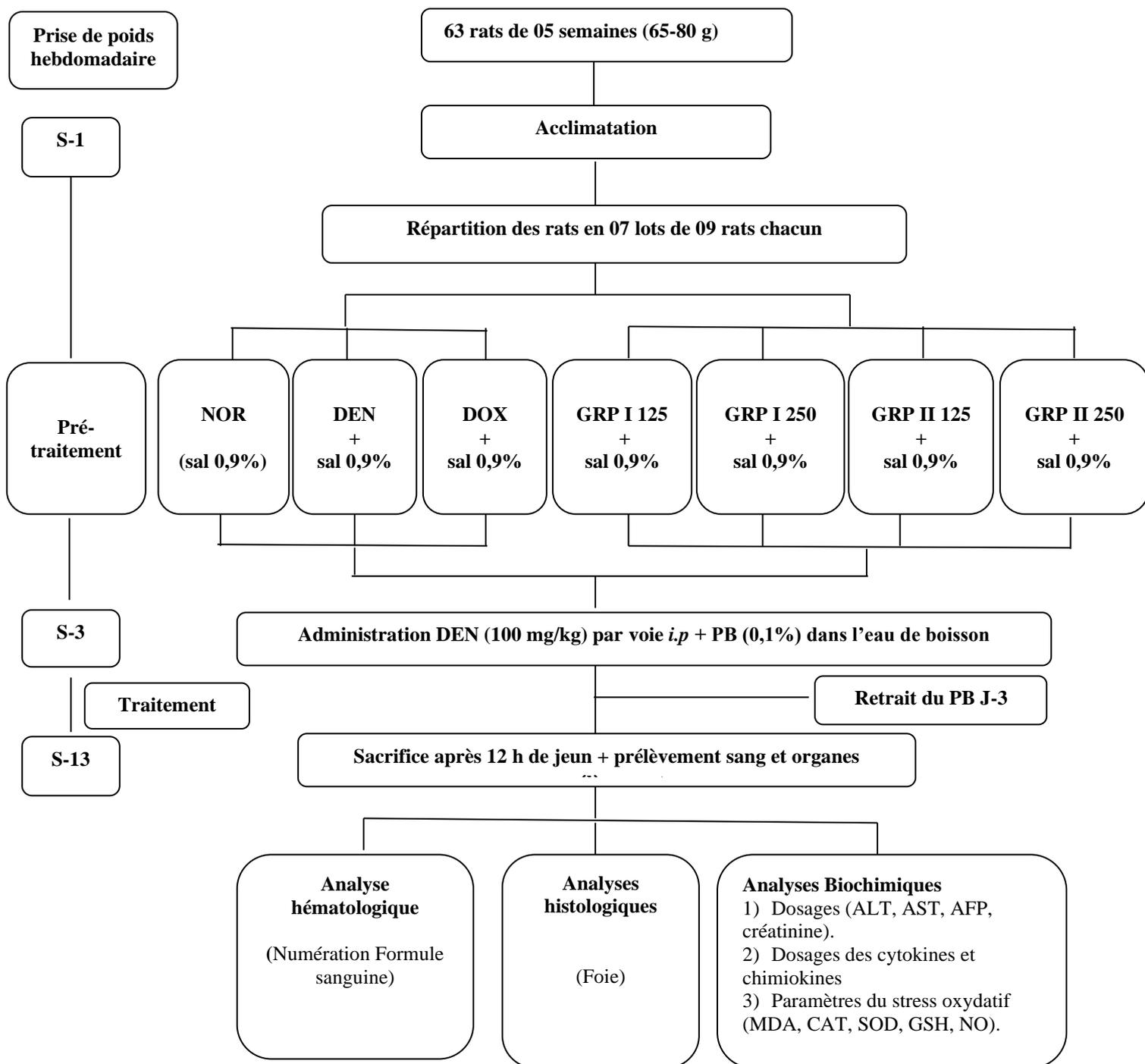


Figure 16 : Protocole de l'évaluation de l'activité antitumorale *in vivo* des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

NOR = Groupe normal (animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; **DEN** = contrôle négatif (animaux ayant reçu le N-diéthylnitrosamine + solution saline 0,9%) ; **DOX** = Contrôle positif (Animaux ayant reçu la doxorubicine + N-diéthylnitrosamine) ; **GRP I** = animaux ayant reçu GRP I + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg ; **GRP II** = animaux ayant reçu GRP II + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg.

II.2.10.3. Préparation du sérum et des homogénats d'organes

➤ Préparation du sérum

Le sang a été collecté dans les tubes secs puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 min à température ambiante. Le sérum (surnageant) a été recueilli, échantillonné et conservé à -80 °C pour des analyses ultérieures.

➤ Préparation des homogénats

Les foies des animaux ont été prélevés, pesés et triturés à froid dans un mortier contenant du tampon phosphate sodium (0,1 M ; pH 7,5) pour obtenir un homogénat à 10%. Après centrifugation (3000 tr/min, 10 min, TA) le surnageant a été recueilli dans les tubes Eppendorf et conservé à -80°C pour des analyses biochimiques.

II.2.10.4. Dosage de quelques marqueurs du stress oxydatif

L'évaluation de la peroxydation lipidique (Yagi, 1976), la détermination de l'activité de la catalase (Sinha, 1972), de la superoxyde dismutase (McCord J et Fridovich, 1969), des taux de glutathion réduit (Ellman, 1969) et d'oxyde nitrique (Marcocci *et al.*, 1994) ont été effectués tels que décrits dans la section II.2.7.2.

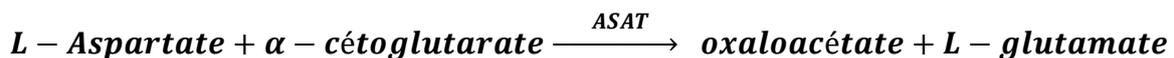
II.2.10.5. Analyses biochimiques

i) Evaluation de l'activité des transaminases

Les activités des enzymes hépatiques Alanine aminotransférase (ALAT) et Aspartate aminotransférase (ASAT) ont été évaluées selon la méthode de Frankel et Reitman (1957).

➤ Principe

L'ALAT et L'ASAT catalysent les réactions de transamination de l'alanine et de l'aspartate en présence de l' α -cétooglutarate pour donner respectivement le pyruvate et l'oxaloacétate selon les équations suivantes :



Le pyruvate et l'oxaloacétate formés réagissent avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine pour former des précipités de couleur jaune qui présentent un maximum d'absorption à 340 nm.

➤ Mode opératoire

Dans les tubes à essai, 1 mL de réactif de travail et 100 μ L de sérum ont été introduits. Les tubes ont été incubés pendant 1 min puis l'absorbance a été lue toutes les minutes pendant 3 min.

➤ Expression des résultats

Le calcul de la moyenne de l'augmentation d'absorbance par min a été effectué comme suit : $U/L \text{ de } ALT = \Delta A/min \times 1750$; $U/L \text{ de } AST = \Delta A/min \times 1750$

ii) Dosage de la créatinine

➤ Principe

Il repose sur la méthode de Jaffé. En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate un complexe jaune orangé. La vitesse de formation de la coloration est proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon (Bartels *et al.*, 1972).

➤ Mode opératoire

Dans un tube à essai, 100 μ L de sérum ont été ajoutés à 1 mL de la solution de travail. Après agitation, l'absorbance a été lue à 520 nm à 30 et à 90 s après stabilisation du mélange.

La concentration en créatinine a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$[\text{Créatinine}](\text{mg/dL}) = \frac{\Delta DO_{(\text{échantillon})}}{\Delta DO_{(\text{Etalon})}} \times [\text{Etalon}](\text{mg/dL})$$

iii) Dosage de l'alphafoetoprotéine (AFP)

L'alphafoetoprotéine est un marqueur biochimique essentiel dans le fonctionnement du foie. Sa teneur dans l'organisme est exploitée pour le diagnostic de l'hépatocarcinome. Elle a été déterminée dans le sérum par la technique ELISA en utilisant le kit Rat α FP (Alpha-Fetoprotein) (E-EL-R0153, Elabscience, Houston, USA) selon les recommandations du fabricant.

➤ Principe

Ce test repose sur le principe d'ELISA en Sandwich. Dans une microplaque de 96 puits des anticorps spécifiques à l'AFP des rats sont préfixés. Les standards et échantillons introduits dans les puits par la suite se combinent spécifiquement aux anticorps de capture. Le complexe "Avidin-Horseradish Peroxidase" (HRP) couplé à l'anticorps de détection biotinylé est ensuite introduit dans chaque puits suivi du substrat. Il apparaît dans les puits contenant l'AFP une coloration bleue qui vire au jaune synonyme de l'arrêt de la réaction enzyme-substrat après ajout d'une solution stop (Figure 17).

La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 450 ± 2 nm. La concentration en AFP est déterminée par extrapolation logarithmique à partir de la courbe d'étalonnage des standards.

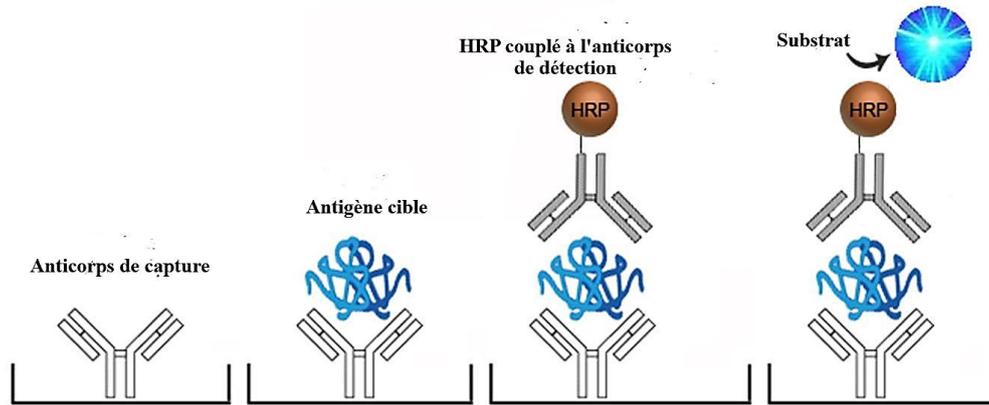


Figure 17 : Principe de la détection et quantification d'un marqueur par la technique ELISA en sandwich.

➤ Mode opératoire

Dans une microplaque de 96 puits, ont été introduits dans les deux premières colonnes et en duplicata 100 μ L de la solution standard de travail aux concentrations (20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,63 ; 0,31 et 0 ng/mL). La plaque a été par la suite scellée et incubée à 37°C pendant 90 min. Après incubation, le surnageant des puits a été vidé puis 100 μ L d'anticorps de détection biotinylé ont été introduits immédiatement dans chaque puits. La microplaque a été à nouveau scellée, remuée légèrement et incubée (37°C, 1 h). Après décantation, 350 μ L de tampon de lavage ont été introduits dans chaque puits puis la microplaque a été incubée durant 2 min. Le contenu de chaque puits a été aspiré à l'aide d'un papier adsorbant sec et propre. Cette opération a été effectuée en tripliquat. Ensuite, 100 μ L de la solution de travail HRP ont été introduits dans chaque puits et la microplaque a été scellée et incubée (37°C, 30 min). La microplaque a été lavée à 05 reprises puis 90 μ L de solution de substrat ont été ajoutés, la plaque a été scellée, recouverte de papier aluminium et incubée à l'obscurité (37°C, 15 min). La réaction a été arrêtée par ajout de 50 μ L d'une solution stop et l'absorbance a été lue sur un lecteur de plaques ELISA (URIT-660) à 450 nm.

II.2.10.6. Analyse hématologique

Les paramètres hématologiques suivants ont été déterminés : le taux de globules blancs (lymphocytes, monocytes, granulocytes), le taux d'érythrocytes, le taux de plaquettes sanguines, le taux d'hématocrite (Hc), le taux d'hémoglobine (Hb), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et le volume globulaire moyen (VGM) à l'aide d'un analyseur automatique d'hématologie Mindray BC 2800 (Shenzhen Mindray Bop-Medical Electronics Co, Ltd).

II.2.10.7. Détection des cytokines/chimiokines par Luminex

La technique "Magnetic Luminex Screening Assay" a été utilisée pour déterminer la quantité de cytokines pro-inflammatoires (G-CSF, IFN- γ , TNF- α) ; anti-inflammatoires (IL-10, IL-12p70) et des chimiokines (éotaxine et fractalkine) dans les sera et les homogénats des tissus sous-cutanés des rats Wistar.

➤ Principe

La technologie du Luminex est une variante de la technique immunoenzymatique, ELISA "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay" réalisée en suspension. Elle permet de détecter et de quantifier simultanément 1 à 100 biomarqueurs dans un micro volume d'échantillon. Son principe repose sur l'utilisation de microsphères (micro perles ou billes de polystyrène) sur lesquelles sont fixés des anticorps dits « de capture ». Ces anticorps permettront la capture des analytes cibles (cytokines) présents dans l'échantillon (Etape 1). Ensuite, des anticorps dits « de détection » couplés à la biotine se fixeront sur les molécules de Streptavidine-Phycoérythrine (Streptavidine-PE) ajoutées à la fin de l'expérimentation. Ces dernières émettent un signal fluorescent grâce à un procédé de bi-coloration, chaque lot de microsphère spécifique à un analyte possède une couleur ou une adresse spectrale spécifique. Ce gradient de coloration permet d'utiliser simultanément jusqu'à cent lots de billes différentes (Etape 2). Lors de la lecture (Etape 3), les billes passent chacune dans le système de lecture de l'appareil Luminex, un cytomètre pourra ainsi premièrement réassocier le signal obtenu via le laser « vert » (635 nm) à l'adresse spectrale de la bille et deuxièmement quantifier l'intensité de la fluorescence via le laser « rouge » (532 nm) à la quantité de Streptavidine-PE liée sur ces billes. Plusieurs analytes peuvent être dosés dans le même puits par introduction du nombre de lot de billes correspondant. L'appareil Luminex les différencie, compte cent billes de chaque lot et réalise une moyenne de la fluorescence (Figure 18).

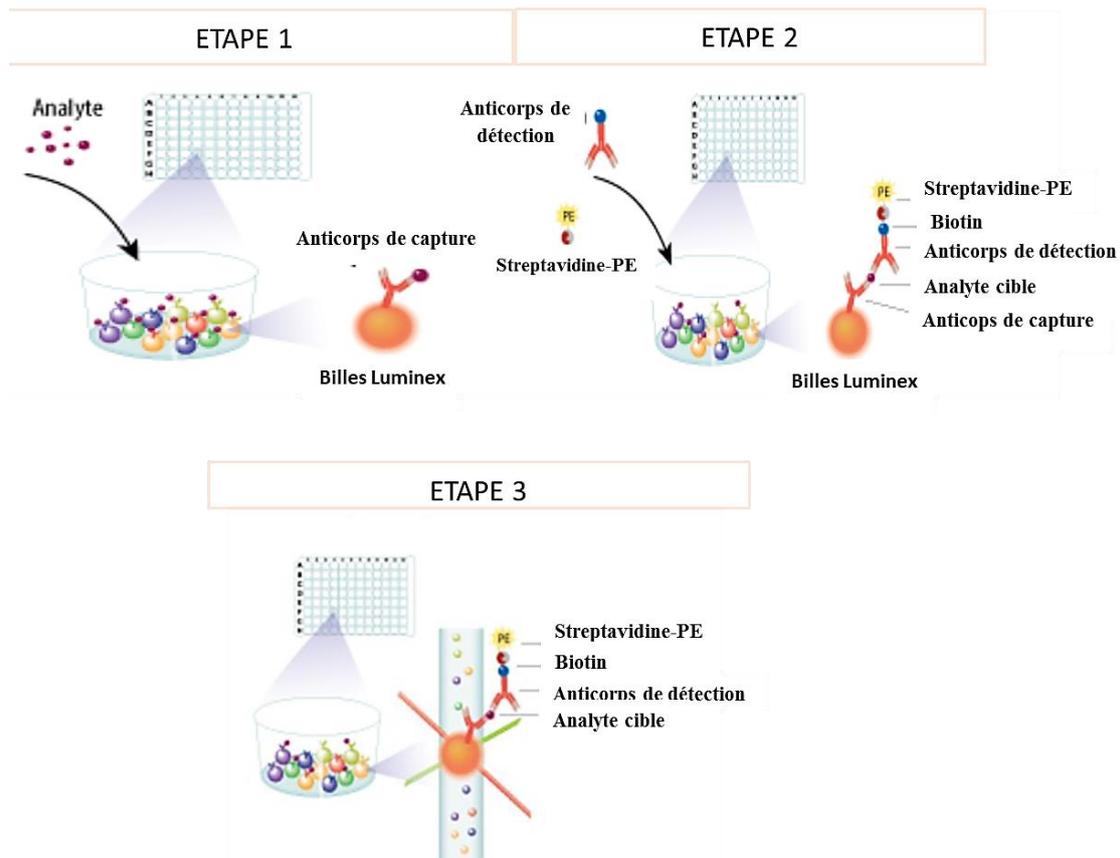


Figure 18 : Principe de la détection et quantification des cytokines par Luminex.

Le laser vert détermine l'adresse spectrale (identité de la microsphère et de la cytokine fixée). Le laser rouge quantifie la quantité de PE (quantité d'anticorps de détection liée aux antigènes) (<http://www.rndsystems.com>).

➤ **Mode opératoire**

Les marqueurs G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p70, éotaxine et fractalkine ont été dosés simultanément à l'aide d'un kit de dosage multiplex "Rat Cytokine/Chemokine magnetic Bead panel" conformément aux instructions du fabricant RECYTMAG-65K (EMD Millipore Corporation, Massassuchets, USA).

Le stock de la suspension en microsphères liées aux anticorps de capture a été soigneusement remis en suspension par vibration et sonication avant utilisation puis diluée à 100 microsphères/ μ L dans un tampon approprié. Parallèlement dans une microplaque de 96 puits (Multiscreen BV ; Millipore, Billerica, MA) ont été introduits 200 μ L/puits de tampon de charge. La microplaque a été placée sous agitation (agitateur de microplaques (Lab-line, Melrose Park, IL) à température ambiante pendant 10 min à 1000 tr/min. Après décantation, 25 μ L de solution standard diluée en série (1:4) dans le tampon de charge et 25 μ L de solution contrôle ont été ajoutés dans les puits appropriés. Puis, 25 μ L de tampon de charge ont été

ajoutés dans les puits "background" (standard à 0 pg/mL) et les puits tests ; tandis que 25 µL de solution matrice ont été introduits dans les puits "background", standards et contrôle. Un volume de 25 µL d'échantillons dilués (1:2) a ensuite été introduit dans les puits tests suivie d'une addition de 25 µL de solution de microsphères dans chaque puits. La microplaque a été scellée, recouverte de papier aluminium puis incubée pendant 2h à l'obscurité sous agitation. Après incubation, la plaque a été soigneusement lavée à deux reprises avec 200 µL de tampon de lavage (PBS 1X). Le lavage a consisté à introduire le volume de tampon correspondant dans chaque puits, puis fixer la plaque sur un support magnétique et retourner l'ensemble sur du papier adsorbant afin d'éliminer le tampon. La microplaque a été ôtée de son support, 25 µL d'anticorps de détection ont été ajoutés dans chaque puits ensuite et la plaque scellée et incubée (1 h à TA). Un volume de 25 µL de Streptavidine-phycoérythrine a été directement ajouté dans les puits, suivie d'une incubation additionnelle sous agitation (30 min, TA) et de deux lavages tels que décrits ci-haut. Enfin 125 µL de fluide de migration ont été introduits dans chaque puits afin d'assurer la suspension des microsphères et leur aspiration par la sonde. L'intensité de la fluorescence a été déterminée par le "Luminex MAGpix Analyzer" (LiquichipM100 QIAGEN, Valencia, CA) qui a été programmé pour la lecture de 100 microsphères par adresse spectrale.

➤ **Expression des résultats**

La courbe des intensités médianes de fluorescences (MFI) des cytokines/chimiokines standard obtenues en fonction de leurs concentrations a permis d'extrapoler les concentrations en pg/mL des différentes cytokines/chimiokines de chaque échantillon grâce au logiciel "5-parameter logistic".

II.2.10.8. Technique d'histologie

L'histologie est une spécialité qui étudie la morphologie et la composition des tissus. Elle consiste en la préparation des tissus/organes en vue de leur observation au microscope. La technique histologique utilisée dans ce travail est celle décrite par Cannet (2004, 2006) telle que suit :

➤ **Fixation**

La fixation a pour but la préservation des cellules et des constituants tissulaires à un état le proche possible du vivant. Ainsi, elle n'apporte aucune modification ni déformation tissulaire, augmente le pouvoir tinctorial des constituants cellulaires afin de faciliter son observation. Le formol 10% a été utilisé à cet effet parce qu'il pénètre très rapidement les tissus (Cannet, 2004).

➤ **Macroscopie**

Le lobe hépatique ou le tissu sous cutané fixé a été sectionné suivant un plan transversal et disposé dans des cassettes en matière plastique et étiquetées.

➤ **Déshydratation**

La déshydratation ou « circulation » se déroule en trois phases : la déshydratation elle-même, l'éclaircissement et l'imprégnation.

✓ **Déshydratation**

Le tissu/organe fixé est inclus dans un milieu solide et rigide (paraffine) puis coupé en tranches fines de l'ordre de quelques micromètres. Pour ce procédé, les tissus sont immergés dans 06 bacs d'alcool, à raison de deux heures par bac dans l'ordre suivant : 01 bac d'éthanol à 70%, 01 bac d'éthanol à 80%, 02 bacs d'éthanol à 95% et 02 bacs d'éthanol à 100%.

✓ **Eclaircissement**

L'éclaircissement consiste à remplacer la solution de déshydratation par un solvant miscible dans le milieu d'inclusion (hydrocarbures benzéniques tels que le xylène ou le toluène). Après déshydratation, les cassettes ont séjourné dans deux bains de xylène (2 x 2 heures).

✓ **Imprégnation**

Elle consiste à incorporer dans les tissus une substance neutre qui durcit les fragments. Les cassettes contenant les fragments d'organes ont été plongées pendant 4 heures (2 heures x 2 bains) dans de la paraffine liquide chaude (60°C).

➤ **Inclusion**

L'inclusion fournit un support externe aux tissus, permettant la réalisation de coupes au microtome. Les tissus sont placés dans des moules remplis de paraffine en fusion, mise à solidifier sur une surface froide (4°C) après orientation appropriée du tissu dans le bloc.

➤ **Coupe**

Les blocs obtenus ont été coupés à l'aide d'un microtome à volant de marque LEICA RM 2125 RT. Des rubans de coupes de 5 µm d'épaisseur obtenus ont été étalés dans un bain-marie contenant de l'eau gélatinée. Au moyen de lames porte-objet propres et étiquetées, les coupes ont été recueillies et séchées à l'étuve à 45°C pendant 24 heures.

➤ **Coloration**

Cette étape permet de visualiser les constituants cellulaires et tissulaires grâce à leur capacité à capter et fixer des colorants de façon plus ou moins sélective. La technique usuelle à base d'hématoxyline-éosine a été adoptée dans cette étude. L'hématoxyline colore les

constituants acides du noyau en bleu-violacé et l'éosine les constituants basiques du cytoplasme en rose-rouge. La procédure de coloration s'est déroulée en deux étapes :

✓ **Déparaffinage et réhydratation**

Les coupes ont été débarrassées de paraffine par immersion pendant 5 minutes dans des bains de xylène et réhydratées dans des bains d'alcool à des concentrations décroissantes jusqu'à l'eau distillée.

✓ **Coloration proprement dite**

Les lames contenant les coupes d'organes, ont été immergées successivement dans les bains d'hématoxyline de Harris, d'eau de robinet, d'eau distillée, d'eau lithinée et d'eau acidifiée, d'alcool à 80% et 95%, d'éosine alcoolique et enfin dans l'éthanol 95%. La procédure est résumée dans le tableau VI.

Tableau VI : Etapes de coloration à l'hématoxyline et l'éosine.

N° de bain	Solutions	Temps
1	Hématoxyline de Harris	10 min
2	Eau de robinet courante	10 min
3	Eau lithinée après passage dans l'eau distillée pendant 1 min	2-3 min
4	Eau acidifiée après passage dans l'eau distillée pendant 1 min	2-3 min
5	Ethanol à 80%	5 min
6	Ethanol à 95%	5 min
7	Eosine alcoolique à 0,5%	5 min
8	Ethanol à 95%	5 min

➤ **Montage**

Les coupes ont été déshydratées dans trois bains d'alcool absolu (3 x 5 minutes) et éclaircies dans trois bains de xylène (3 x 5 minutes) avant le montage. Les lames ont été montées dans de la résine synthétique (baume de Canada) non miscible à l'eau, sur des lamelles en verre afin de les protéger et les conserver.

II.2.11. Analyses statistiques

Les données obtenues dans cette étude ont été exprimées sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (ESM) pour les variables quantitatives et de pourcentages pour les variables qualitatives. Les analyses statistiques et le tracé des graphes ont été effectués par le logiciel " GraphPad Prism " version 8.01. Le test ANOVA a été utilisé pour la comparaison

des moyennes suivi du test de comparaison multiple Dunnet's pour la comparaison des groupes tests au groupe non-traité ou traité. Les indices #, ##, ### traduisent des seuils de significativité statistiques respectivement inférieures à 0,05 ; 0,01 et 0,001 en comparaison au groupe normal (groupe n'ayant reçu aucun traitement). Les indices *, **, *** dénotent des seuils de significativité statistiques à des valeurs de p respectivement inférieures à 0,05 ; 0,01 et 0,001 en comparaison au groupe contrôle négatif. Les valeurs affectées des lettres (a, b, c, d...) différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.



**Chapitre III :
Résultats et
discussion**



III.1. Caractérisation chimique et effets antioxydants des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*

III.1.1. Rendements d'extraction

Le tableau VII présente les rendements d'extraction des différents extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*. A partir de 250 g de poudre sèche de *G. resinaceum*, 2,8 g d'extrait aqueux brut de *G. resinaceum* (GRT) ont été obtenus par décoction soit un rendement de 1,12%. Par ailleurs, 500 g de poudre sèche de *G. resinaceum* ont permis d'obtenir respectivement 0,71 et 1,74 g d'extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II soient des rendements d'extraction de 0,28 et 0,6%. Les extraits polysaccharidiques EPS I (0,19 g/L) et EPS II (0,12 g/L) ont été obtenus après précipitation de 500 mL de bouillon de culture MCM à l'éthanol 95° à 60 et 80% respectivement. Cependant, 0,75 g de l'extrait mycélien (MYC) a été obtenu après fermentation de mycélium dans 500 mL de milieu de culture MCM ; soit une teneur de 1,5 g/L.

Tableau VII : Rendements d'extraction en pourcentages des extraits par rapport à la masse de carpophore sec.

Extraits	Rendements
GRT	1,12%
GRP I	0,28%
GRP II	0,6%
EPS I	0,12 g/L
EPS II	0,19 g/L
MYC	1,5 g/L

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II* : extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC* : extrait mycélien et *GRT* : extrait brut de *G. resinaceum*.

III.1.2. Analyse phytochimique des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

III.1.2.1. Analyse qualitative

Les résultats du screening phytochimique qualitatif des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sont consignés dans le tableau VIII. Il en ressort que les classes de métabolites secondaires varient selon la nature de l'extrait. L'extrait brut des carpophores renferme toutes les classes de métabolites secondaires recherchées à l'exception des tannins ; tandis que l'extrait mycélien ne renferme que les composés phénoliques et les mycéliens. Cependant, la fermentation liquide du mycélium a entraîné la production d'autres métabolites retrouvés dans

les extraits EPS I et EPS II (alcaloïdes et tannins). Par contre, les anthocyanines ont été retrouvés en plus dans les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II.

Tableau VIII : Analyse qualitative des métabolites secondaires des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

Extraits polysaccharidiques						
Classes de métabolites	EPS I	EPS II	GRP I	GRP II	MYC	GRT
Saponines	-	-	+	+	-	+
Composés phénoliques	+	+	+	+	+	+
Flavonoïdes	-	+	-	+	+	+
Anthocyanines	-	-	+	-	-	+
Alcaloïdes	-	+	+	-	-	+
Triterpènes	-	-	-	+	+	+
Tannins	+	+	+	+	-	-

(+ = présent ; - = absent)

III.1.2.2. Analyse quantitative de quelques classes de métabolites

La caractérisation chimique partielle des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* par les méthodes de Bradford, Singleton & Rossi et Dubois révèle la présence à des teneurs variées des protéines ; composés phénoliques et sucres totaux dans les différents extraits. La figure 19 illustre les teneurs en protéines, composés phénoliques et sucres totaux des différents extraits déterminées. Les protéines sont faiblement répandues dans les différents extraits soient des pourcentages respectifs de EPS I (5,62%), EPS II (9,12%), GRP I (6,73%), GRP II (9,23%) ; MYC (6,93%) et GRT (8,76%). De même, d'une manière générale les composés phénoliques sont présents en faible quantité dans les différents extraits soient des teneurs respectives de EPS I (6,05%), EPS II (2,43%), GRP I (12,72%), GRP II (7,99%), MYC (6,22%) et GRT (7,86%), et respectivement. Les sucres totaux sont plus abondants dans les extraits polysaccharidiques des carpophores issus de la nature GRP I et GRP II soient des teneurs respectives de 65,88 et 63,96%. Les extraits EPS I, EPS II, MYC et GRT possèdent des teneurs respectives en sucres totaux de 18,96 ; 26,42 ; 13,26 et 9,35%.

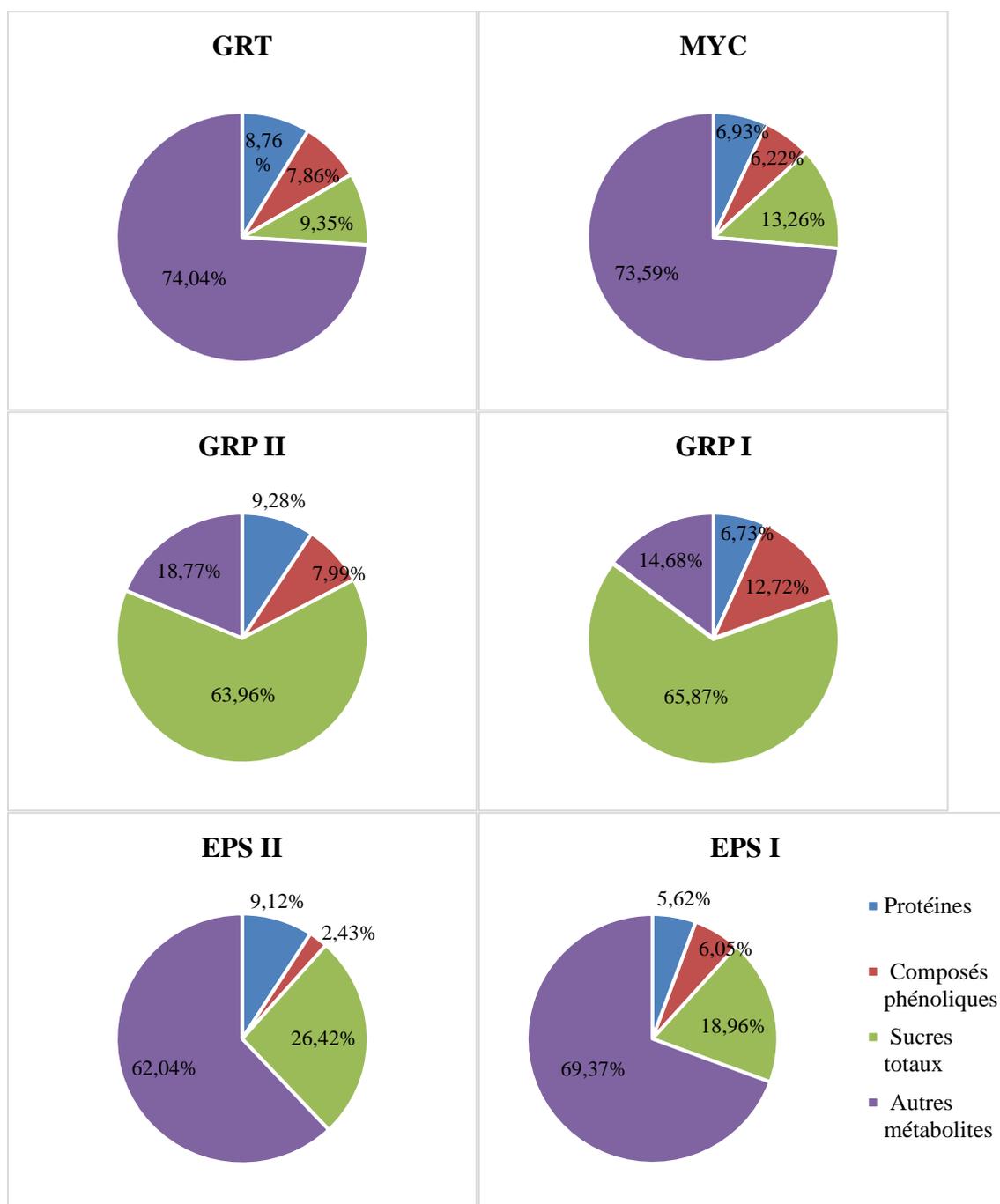


Figure 19 : Composition centésimale de quelques classes de métabolites présents dans les extraits bruts et polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II :* extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC :* extrait mycélien et *GRT :* extrait brut de *G. resinaceum*.

III.1.3. Activités anti-radicales et antioxydantes des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*

III.1.3.1. Activité anti-radicalaire DPPH

La figure 20 illustre l'activité de piégeage DPPH des extraits bruts et polysaccharidiques de *G. resinaceum*. Tous les extraits aux concentrations comprises entre 25 et 200 µg/mL ont

présenté des activités anti-radicales DPPH• dose dépendante. A 25 µg/mL, les extraits GRT, MYC, EPS I, EPS II, GRP II et GRP I ont présenté des pourcentages d'inhibition respectifs de $32,98 \pm 1,87$; $45,91 \pm 2,08$; $48,85 \pm 2,89$; $55,47 \pm 2,59$; $45,91 \pm 2,08$; $56,22 \pm 2,72$ et $66,13 \pm 2,59\%$. Toutefois, les extraits GRP I et GRP II ont présenté les meilleurs pourcentages d'inhibition à 200 µg/mL, soient $77,35 \pm 2,89$ et $77,86 \pm 2,10\%$; suivies des extraits EPS II ($74,52 \pm 1,90\%$), EPS I ($70,86 \pm 3,81\%$), MYC ($45,91 \pm 2,08\%$) et GRT ($38,02 \pm 3,56\%$). Ces activités anti-radicales sont significativement ($p < 0,05$) inférieures à celles des standards que sont l'acide gallique et la catéchine qui présentent de meilleurs pourcentages d'inhibition aux faibles doses (0,1 – 100 µg/mL) avec des pics de $85,55 \pm 2,22$ et $85,19 \pm 5,63\%$ à 100 µg/mL.

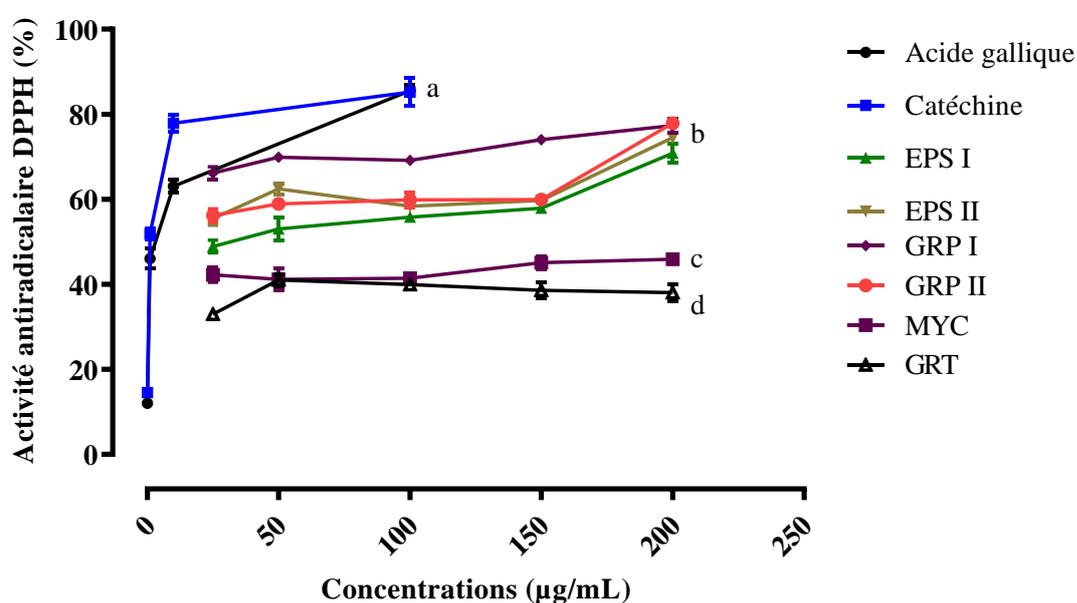


Figure 20 : Activité anti-radicalaire DPPH des standards (acide gallique et catéchine) et des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II :* extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC :* extrait mycélien et *GRT :* extrait brut de *G. resinaceum*. Différence significative à $p < 0,05$ ($a > b > c > d$).

III.1.3.2. Activité anti-radicalaire ABTS

Cette méthode mesure la perte de couleur du radical $ABTS^+$ en présence d'un antioxydant hydrophile ou lipophile. Le radical $ABTS^+$ est un chromophore stable de couleur verte que l'on ne retrouve pas chez les êtres humains.

La figure 21 présente l'activité anti-radicalaire ABTS des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*. Il en découle que tous les extraits aux concentrations variant de 25 à 200 µg/mL ont présenté des activités anti-radicales ABTS à des intensités différentes. Ainsi,

l'extrait polysaccharidique issu du carpophore naturel GRP II a présenté la meilleure activité à 200 µg/mL, soit $56,98 \pm 1,72\%$ suivie des extraits MYC ($49,67 \pm 1,17\%$) ; GRT ($48,76 \pm 1,38\%$), EPS II ($45,95 \pm 1,49\%$) ; GRP I ($43,91 \pm 0,46\%$) et EPS I ($40,01 \pm 0,94\%$). Cependant les pourcentages d'inhibition les plus faibles ont été observés à la concentration 25 µg/mL, soient EPS I ($37,24 \pm 0,83\%$), EPS II ($41,09 \pm 3,07\%$), GRP I ($39,08 \pm 1,52\%$), GRP II ($38,50 \pm 0,80\%$) ; MYC ($12,53 \pm 1,68\%$) et GRT ($15,45 \pm 2,76\%$). Toutefois, ces activités demeurent significativement inférieures ($p < 0,05$) à celles de l'acide gallique ($97,54 \pm 0,92\%$) et de la catéchine ($88,49 \pm 1,07\%$) à 100 µg/mL.

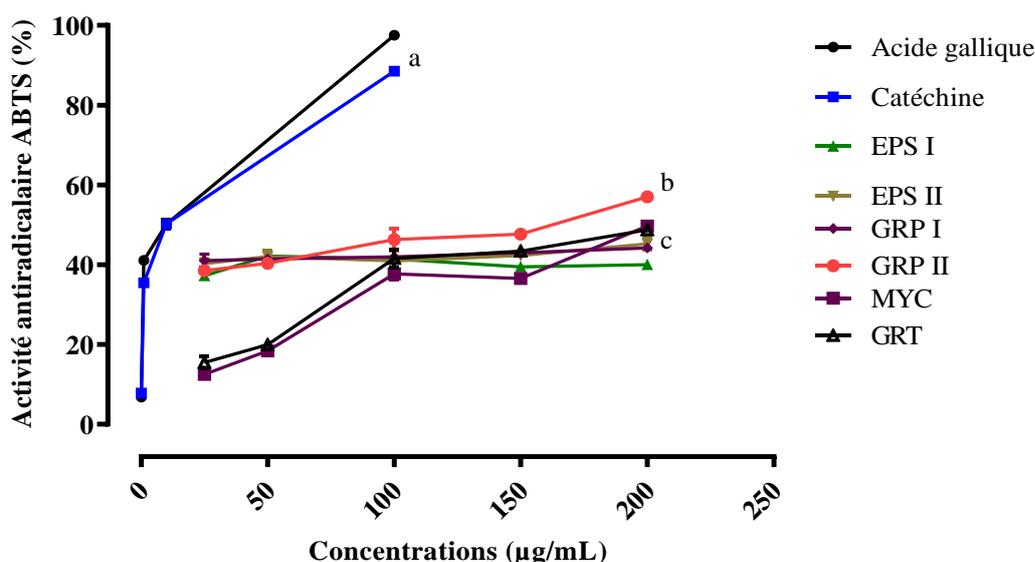


Figure 21 : Activité anti-radicalaire ABTS des standards (acide gallique et catéchine) et des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II :* extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC :* extrait mycélien et *GRT :* extrait brut de *G. resinaceum*. Différence significative à $p < 0,05$ ($a > b > c$).

III.1.3.3. Activité chélatrice des ions ferreux

La figure 22 présente l'activité chélatrice des ions ferreux des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*. Il en ressort que tous les extraits possèdent un pouvoir chélateur dose dépendant vis-à-vis des ions ferreux en présence de la ferrozine. A 25 µg/mL, de faibles pourcentages d'inhibition ont été notés soient EPS I ($5,40 \pm 0,38\%$), EPS II ($5,57 \pm 0,76\%$), GRP I ($6,31 \pm 2,02\%$), GRP II ($9,28 \pm 1,15\%$), MYC ($30,03 \pm 0,19\%$) et GRT ($25,62 \pm 3,85\%$). Tandis qu'à 200 µg/mL, GRP II a présenté la meilleure activité ($51,95 \pm 0,45\%$) suivie de GRT ($51,20 \pm 4,00\%$), MYC ($50,76 \pm 4,27\%$), EPS II ($47,92 \pm 1,88\%$), EPS I ($44,49 \pm 1,48\%$) et GRP I ($46,63 \pm 1,04\%$). Néanmoins ces activités chélatrices des extraits de *G.*

resinaceum sont significativement inférieures à celles du standard (EDTA) à 100 µg/mL soit $89,02 \pm 5,66\%$ ($p < 0,05$).

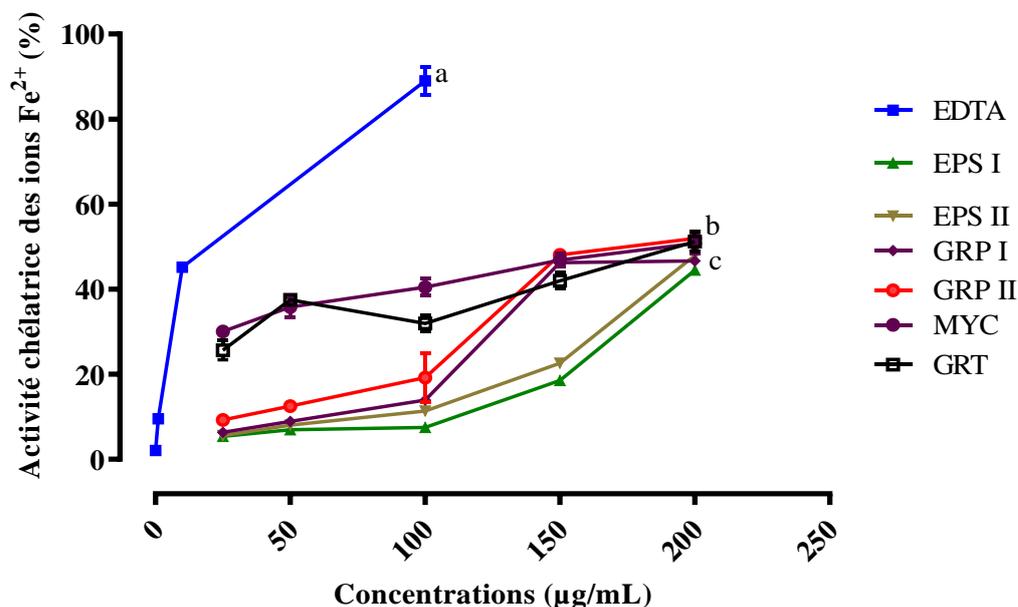


Figure 22 : Activité chélatrice des ions ferreux du standard EDTA et des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II* : extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC* : extrait mycélien et *GRT* : extrait brut de *G. resinaceum*. Différence significative $p < 0,05$ ($a > b > c$).

III.1.3.4. Evaluation du pouvoir réducteur du fer

La figure 23 présente le pouvoir réducteur des extraits bruts et polysaccharidiques de *G. resinaceum* obtenu à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Annexe 8). Il ressort de cette analyse que tous les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont la capacité de réduire les ions ferriques en ions ferreux. Cependant, l'extrait MYC présente le meilleur pouvoir réducteur soit $25,22 \pm 4,61$ EAG/ mg de matière sèche ($p < 0,05$). Les extraits EPS I, GRT, GRP I, GRP II et EPS I ont présenté des pouvoirs réducteurs de $16,65 \pm 0,54$; $8,05 \pm 1,61$; $7,46 \pm 0,73$; $6,90 \pm 0,54$; $1,10 \pm 0,27$ EAG/mg de matière sèche.

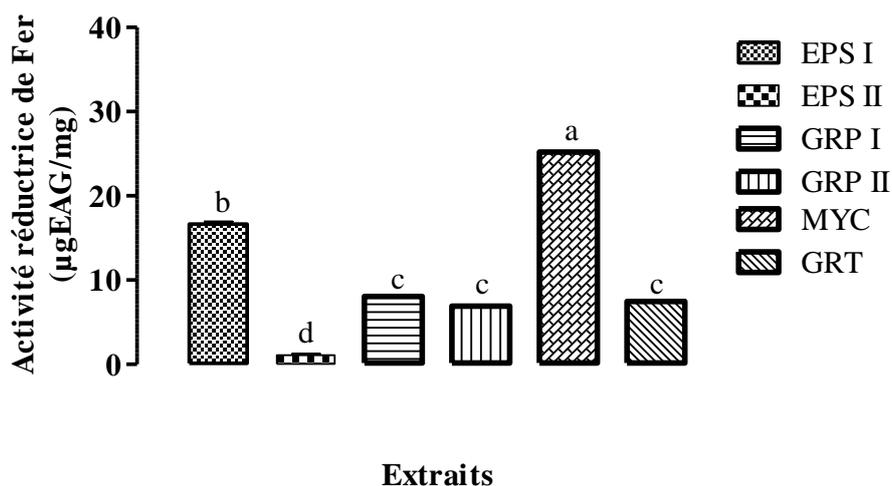


Figure 23 : Activité réductrice des ions ferriques des extraits polysaccharidiques des carpophores de *G. resinaceum*.

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II* : extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC* : extrait mycélien et *GRT* : extrait brut de *G. resinaceum*. Différence significative $p < 0,05$ ($a > b > c$).

III.1.3.5. Activité de piégeage de l'oxyde nitrique

L'activité de piégeage de l'oxyde nitrique par les extraits bruts et polysaccharidiques de *G. resinaceum* est illustrée à la figure 24. Il en ressort qu'aux concentrations 25, 50, 100, 150 et 200 µg/mL, tous les extraits ont présenté une habilité à piéger le radical NO. Les pourcentages d'inhibition les moins élevés ont été observés à 25 µg/mL, soient respectivement $4,56 \pm 0,96$; $9,24 \pm 1,38$; $32,90 \pm 2,02$; $27,45 \pm 1,56$; $18,42 \pm 3,96$ et $22,18 \pm 4,02\%$ pour les extraits EPS I, EPS II, GRP I, GRP II, MYC et GRT. Cependant, GRP II et GRP I ont présenté les meilleurs pourcentages d'inhibition à 200 µg/mL soient respectivement $63,45 \pm 0,60\%$ et $62,83 \pm 2,45\%$; tandis que les extraits GRT ; EPS I ; EPS II et MYC ont respectivement présenté des pourcentages de $40,32 \pm 3,31\%$; $36,57 \pm 3,55\%$; $36,33 \pm 2,91$ et $17,27 \pm 1,57\%$. En revanche, ces activités sont significativement inférieures à celles du standard nitrite de sodium (NaNO_2) à 100 µg/mL avec $81,43 \pm 2,93\%$.

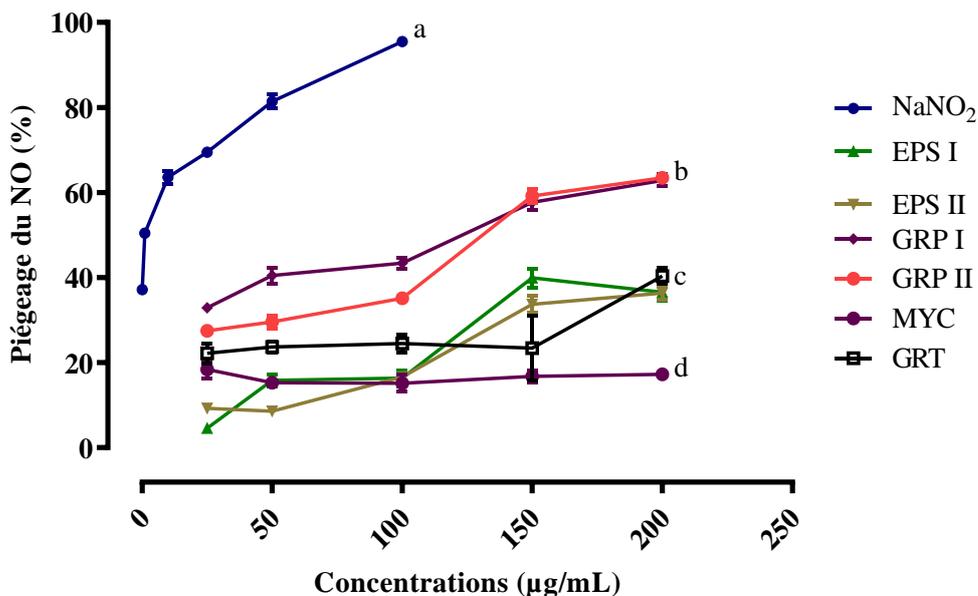


Figure 24 : Activité de piégeage de l'oxyde nitrique du standard NaNO₂, des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II* : extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC* : extrait mycélien et *GRT* : extrait brut de *G. resinaceum*. Différence significative à $p < 0,05$ ($a > b > c$).

Les meilleures activités antioxydantes *in vitro* des extraits polysaccharidiques issus du carpophore de *G. resinaceum* sont confirmées par les faibles concentrations inhibitrices 50 (IC₅₀) de GRP I et GRP II (Tableau IX).

Tableau IX : Concentrations effectrices 50 (CE₅₀) des extraits de *G. resinaceum* et des standards.

	CE ₅₀ (µg/mL)			
	DPPH	ABTS	Chélation des ions Fe ²⁺	Piégeage de NO
EPS I	58,51	153,7	153,8	319,5
EPS II	43,50	136,7	153,6	361,7
GRP I	24,20	135,7	110,1	97,42
GRP II	43,13	107,5	114,8	119,7
MYC	129,4	207,8	86,18	664,1
GRT	169,1	180,8	99,20	301,0
Acide gallique	1,95	5,11	/	/
Catéchine	1,05	6,69	/	/
EDTA	/	/	9,73	/
NaNO₂	/	/	/	0,10

III.1.4. Effets des extraits polysaccharidiques sur quelques marqueurs du stress oxydatif *in vivo*

Les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II ont présenté les meilleures activités antioxydantes *in vitro* aux concentrations testées. Par conséquent GRP I et GRP II ont été sélectionnés pour l'évaluation des activités antioxydantes chez un modèle expérimental hypergalactosémique.

III.1.4.1. Effets des extraits polysaccharidiques sur la peroxydation lipidique

Les effets des extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II sur les taux de MDA dans le cerveau, le foie, le cœur, le rein et l'hémolysât sont illustrés à la figure 25. L'administration du D-galactose à la dose de 100 mg/kg accroît significativement le taux de MDA dans le groupe contrôle négatif en comparaison au groupe normal. Par ailleurs, tout comme le contrôle positif, les traitements aux extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II à 125 mg/kg réduisent significativement le taux de MDA en comparaison au groupe contrôle négatif. Les meilleures activités étant observées dans le groupe traité à GRP I. Cette activité inhibitrice de la peroxydation lipidique varie selon les tissus cibles avec des taux de MDA les plus faibles notés dans le cerveau et le foie.

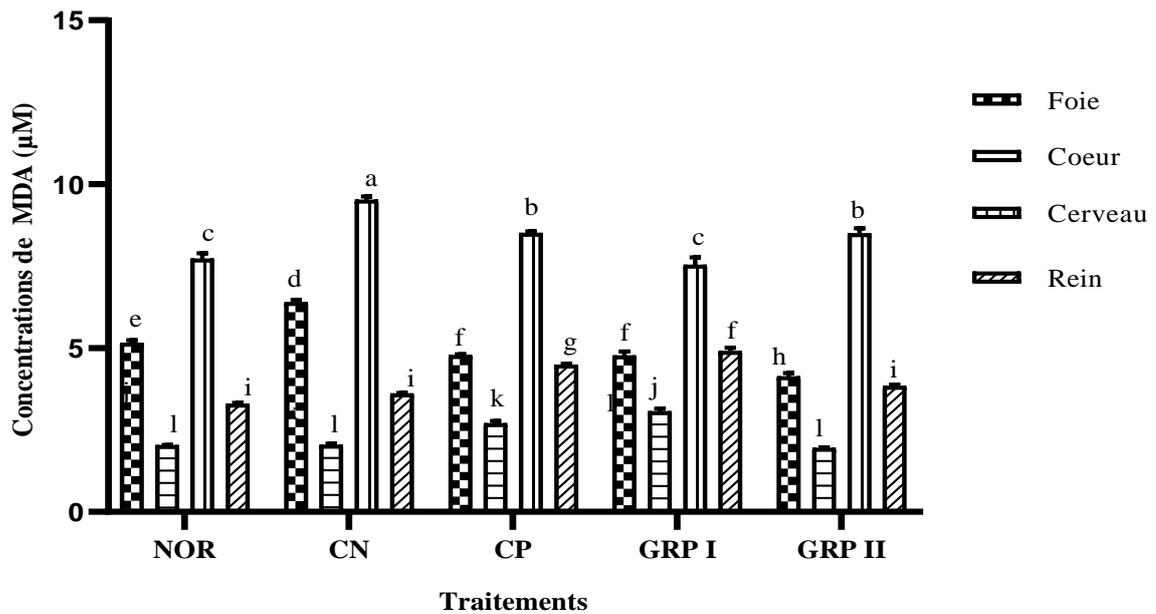


Figure 25 : Effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de *G. resinaceum* et de la vitamine C sur le taux de malondialdéhyde dans le foie, le cœur, le cerveau et le rein.

NOR : Groupe normal (animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; *CN* : Groupe contrôle négatif (animaux ayant reçu le D-galactose + solution saline 0,9%) ; *CP* : Groupe contrôle positif (animaux ayant reçu la vitamine C + D-galactose) ; *GRP I et GRP II* : Animaux ayant reçu GRP I et GRP II à la dose de 125 mg/kg + D-galactose. Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM ($n=7$). Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe normal (*NOR*) ont été exposés au D-galactose (100 mg/kg) pendant 14 jours. Différence significative à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e > f > g > h > i > j > k$).

III.1.4.2. Effets des extraits polysaccharidiques sur l'activité de la catalase

La figure 26 présente les effets de la vitamine C et des extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II sur l'activité de la catalase dans le foie, le cœur, le cerveau et le rein et l'hémolysât. Il en ressort que l'administration du D-galactose entraîne une diminution significative de l'activité de la catalase par rapport au groupe contrôle normal. Tandis que tout comme la vitamine C, GRP I et GRP II à 125 mg/kg entraînent une augmentation significative de l'activité de la catalase en comparaison au groupe contrôle négatif. Cette activité antioxydante varie en fonction du tissu avec des pics notés dans les homogénats de cerveau et de foie des groupes traités à GRP I, soient $22,87 \pm 1,24$ et $17,55 \pm 0,39$ mmol de H_2O_2 /min/mg de protéine dans le cerveau et le foie respectivement. Cependant, cette activité demeure significativement basse par rapport à celle de la vitamine C à 100 mg/kg dans les organes étudiés ($24,01 \pm 1,23$ mmol de H_2O_2 /min/mg de protéine).

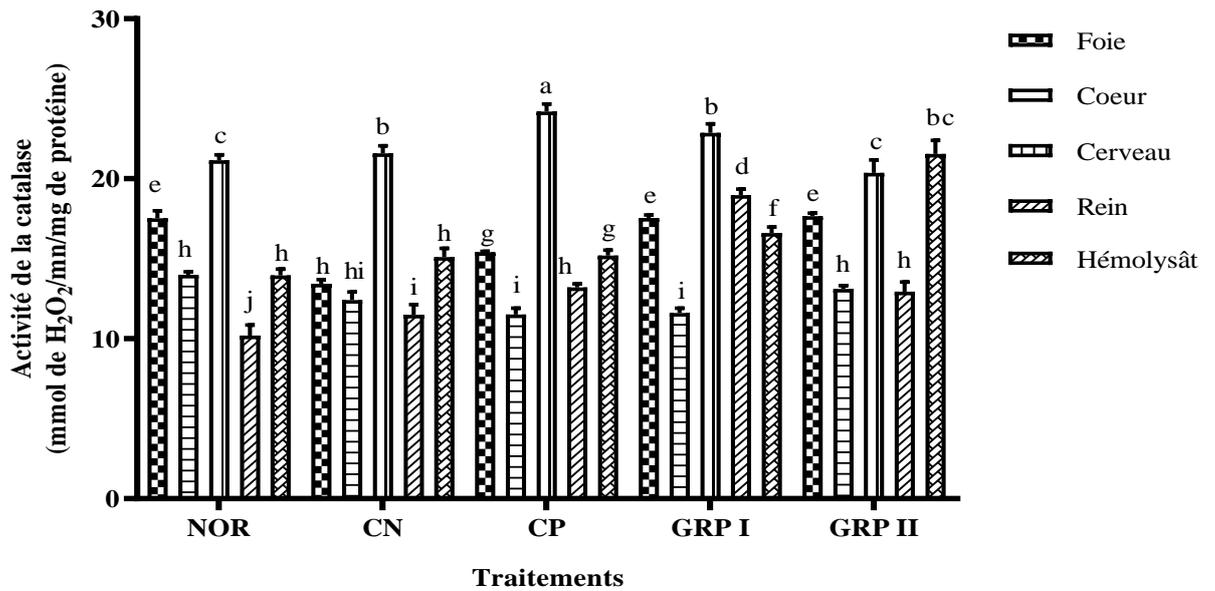


Figure 26 : Effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de *G. resinaceum* et de la vitamine C sur l'activité de la catalase dans le foie, le cœur, le cerveau, le rein et l'hémolysât.

NOR : Groupe normal (Animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; **CN :** Groupe contrôle négatif (Animaux ayant reçu le D-galactose + solution saline 0,9%) ; **CP :** Groupe contrôle positif (Animaux ayant reçu la vitamine C + D-galactose) ; **GRP I et GRP II :** Animaux ayant reçu GRP I et GRP II à la dose de 125 mg/kg + D-galactose. Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (n=7). Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe normal (NOR) ont été exposés au D-galactose (100 mg/kg) pendant 14 jours. Différence significative à $p < 0,05$; $a > b > c > d > e > f > g > h > i > j$.

III.1.4.3. Effets des extraits polysaccharidiques sur l'activité de la superoxyde dismutase

L'observation de la figure 27 révèle que chez tous les organes étudiés, l'administration du D-galactose induit une diminution significative de l'activité de la SOD comparativement au groupe normal sauf dans le cœur. D'une manière générale, la vitamine C et les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II induisent une hausse significative de l'activité de la SOD par rapport au contrôle négatif. Cependant, cette activité varie en fonction de l'organe et cible et est plus prononcée chez les animaux traités au GRP I dans le rein, le cerveau, et le foie précisément soient $15,07 \pm 0,95$; $14,47 \pm 0,98$ et $13,27 \pm 1,27$ U/mg.

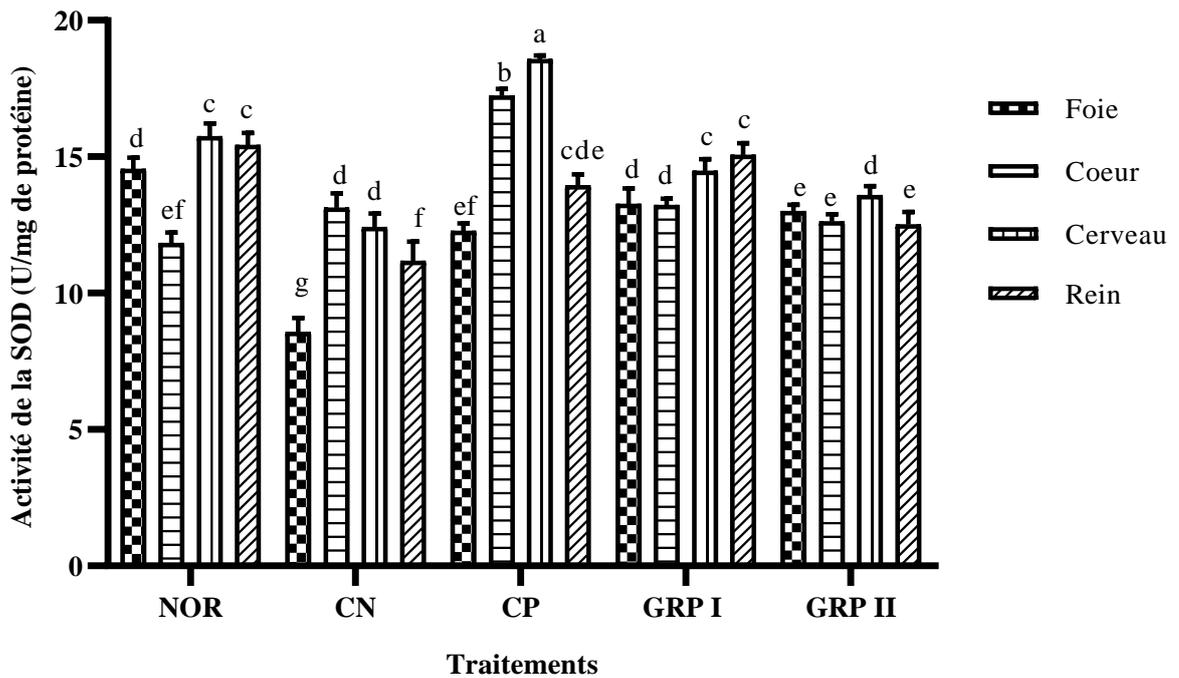


Figure 27 : Effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de *G. resinaceum* et de la vitamine C sur l'activité de la SOD dans le foie, le cœur, le cerveau et le rein.

NOR : Groupe normal (animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; **CN :** Groupe contrôle négatif (animaux ayant reçu le D-galactose + solution saline 0,9%) ; **CP :** Groupe contrôle positif (animaux ayant reçu la vitamine C + D-galactose) ; **GRP I et GRP II :** animaux ayant reçu GRP I et GRP II à la dose de 125 mg/kg + D-galactose. Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (n=7). Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe normal (NOR) ont été exposés au D-galactose (100 mg/kg) pendant 14 jours. Différence significative à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e$).

III.1.4.4. Effets des extraits polysaccharidiques sur la production de l'oxyde nitrique

La figure 28 illustre les effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) et de la vitamine C, sur la production de l'oxyde nitrique en cas de stress oxydatif chez des rats hypergalactosémiques. Il en ressort que l'induction du stress oxydatif par le D-galactose à 100 mg/kg, induit dans le plasma, le cerveau et le rein une surproduction du taux d'oxyde nitrique (NO) comparativement au groupe normal. Par ailleurs, les traitements à la vitamine C à GRP I et à GRP II provoquent une réduction significative du taux de NO dans les organes étudiés par rapport au groupe contrôle négatif. Les activités les plus importantes sont observées dans le plasma et l'homogénat du cerveau des animaux du groupe GRP II ; soient $2,79 \pm 0,22$ et $3,01 \pm 0,51$ μ M respectivement.

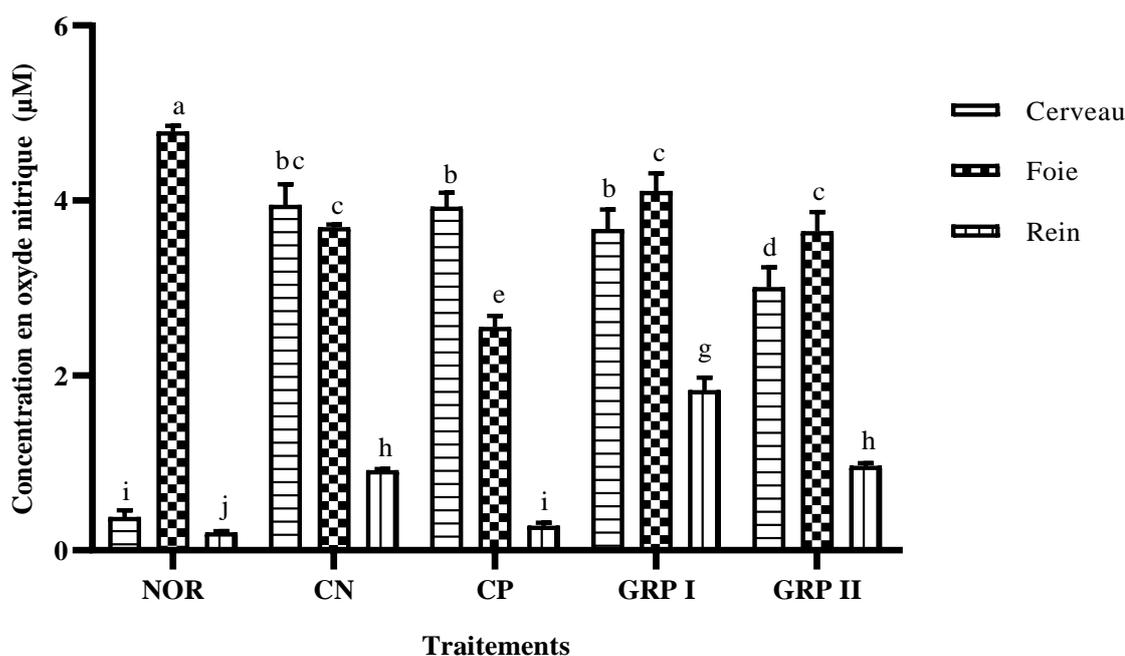


Figure 28 : Effets des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de *G. resinaceum* et de la vitamine C sur le taux d'oxyde nitrique dans le cerveau, le foie, et le rein.

NOR : Groupe normal (animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; **CN :** Groupe contrôle négatif (animaux ayant reçu le D-galactose + solution saline 0,9%) ; **CP :** Groupe contrôle positif (Animaux ayant reçu la vitamine C + D-galactose) ; **GRP I et GRP II :** Animaux ayant reçu GRP I et GRP II à la dose de 125 mg/kg + D-galactose. Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (n=7). Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe normal (NOR) ont été exposés au D-galactose (100 mg/kg) pendant 14 jours. Différence significative à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e$).

III.1.5. Discussion partielle 1

Les polysaccharides constituent les macromolécules les plus répandues aussi bien dans l'écosystème terrestre que dans l'écosystème marin. Le foisonnement de ces composés dans le règne végétal, couplé à leur faible toxicité et leurs multiples d'activités biologiques justifie leur exploitation dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. Les champignons à l'occurrence *Ganoderma resinaceum* sont des espèces végétales très riches en polysaccharides et nécessitent un intérêt particulier. Etant donné la diversité, la complexité de la structure la localisation de ces molécules dans le tissu végétal, des méthodes sélectives ont été développées pour une extraction optimale. Dans cette étude, les extraits totaux ont été obtenus par décoction (GRT) et fermentation mycélienne (MYC). Tandis que les extraits polysaccharidiques ont été obtenus d'une part par décoction à l'eau chaude et précipitation à l'alcool (GRP) et d'autre part par fermentation sur milieu liquide (EPS) suivie d'une

extraction par précipitation à l'alcool. Ainsi les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II ont présenté de meilleurs rendements d'extraction (0,28 et 0,6% respectivement) par rapport aux extraits polysaccharidiques EPS I et EPS II soient 0,19 et 0,12 g/L respectivement. Cette différence pourrait s'expliquer par le caractère prépondérant et facilement extractible des polysaccharides extracellulaires dans les champignons. La décoction à l'eau chaude suivie d'une précipitation à l'alcool à différentes concentrations permet d'obtenir généralement des polysaccharides totaux de différents poids moléculaires et de structure β -D-glucanes majoritairement (Bleha *et al.*, 2022). Le rendement d'extraction des polysaccharides est fonction non seulement de la nature du solvant (acide, neutre, alcalin) mais également du nombre de répétition, du rapport soluté/solvant, de la granulométrie des particules, de la température et de la durée d'extraction (Tinamri et Lagmi, 2014). La fermentation liquide d'un substrat peut être influencée par l'environnement, le pH du milieu, la nature du milieu de culture ce qui expliquerait la différence entre les résultats obtenus et ceux rapportés par Wu *et al.* (2018) et Kim *et al.* (2006) sur la production des exopolysaccharides de *G. resinaceum* par fermentation liquide. Les polysaccharides des basidiomycètes sont généralement de nature glucanes (Stoica *et al.*, 2023). Les extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) de *G. resinaceum* ont présenté des teneurs plus élevées en sucres totaux par rapport aux exopolysaccharides (EPS I et EPS II) ce qui suggère une plus grande richesse de GRP I et GRP II en glucanes. Toutefois, les polysaccharides sont étroitement liés aux composés phénoliques (lignine, subérine...), les lipides et les protéines qui constituent la membrane de la cellule végétale. Cette structure complexe favorise aussi l'extraction de certains composés non polysaccharidiques lors de l'extraction des polysaccharides par des méthodes chimiques et/ou enzymatiques (Hua *et al.*, 2014 ; Boudjeko *et al.*, 2015 ; Mediesse *et al.*, 2018). Ainsi des teneurs variées en protéines et en composés phénoliques ont été décelées dans les extraits de *G. resinaceum* suggérant la nature glycoprotéique de la paroi des mycètes (Michez, 2016).

Chez la plupart des organismes vivants, le métabolisme assure la production d'énergie par oxydation des composés organiques nécessaire au maintien des fonctions vitales au niveau cellulaire. Malgré l'importance des oxydations, ces dernières peuvent si elles sont incontrôlées générer des espèces réactives oxygénées (ERO) qui en excès sont néfastes pour la santé humaine (Liochev, 2013). A cet effet, les antioxydants dits primaires grâce à leur nombreux groupements hydroxyles liés à un ou plusieurs groupements benzéniques sont capables de piéger les radicaux libres par transfert d'un atome d'hydrogène ; tandis que les antioxydants chélateurs ont un fort potentiel d'isomérisation et peuvent donc transférer les électrons à l'oxygène activé et aux métaux lourds prévenant ainsi l'oxydation (Oukalha *et al.*,

2018). Les antioxydants dits secondaires quant à eux sont préventifs et influencent les autres agents d'oxydation empêchant ainsi la propagation de la cascade en chaîne de la réaction radicalaire (Gulsen *et al.*, 2015). La complexité de la nature des métabolites et la spécificité des tests antioxydants impose l'utilisation de plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante d'un extrait de plante. Dans cette étude, les tests antiradicalaires DPPH et ABTS ont été effectués pour évaluer la capacité des extraits à capter un proton d'une molécule ou d'un extrait formant ainsi un radical stable. La molécule 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable grâce à la délocalisation de l'électron de réserve sur la molécule dans son ensemble. Le radical DPPH présente une coloration violette foncée à l'état initial et une absorption maximale à 517 nm. Le pouvoir anti-radicalaire se traduit par l'habilité d'un substrat (AH) à céder un proton pour donner la forme réduite DPPH-H (Jin *et al.*, 2012b). Le radical ABTS est un chromophore instable de couleur verte absent chez les êtres vivants. La mesure de la réduction de la couleur rouge du complexe ferrozine-Fe²⁺ détermine l'activité chélatrice des ions ferreux (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Le pouvoir réducteur du fer mesure l'habilité des antioxydants à réduire le complexe ions ferrique-chlorure de 2,3,5-triphényl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diène (TPTZ-Fe³⁺) ayant une absorption maximale à 593 nm en ions ferreux à pH faible (Benzie et Strain, 1999). Le radical NO est généré par les tissus biologiques sous l'action des synthases. En aérobie, le radical NO réagit avec l'oxygène pour produire des composés stables pouvant être quantifiés en utilisant le réactif de Griess (Maccocci *et al.*, 1994). Ainsi, la capacité d'un extrait ou composé à piéger le radical NO constitue une méthode d'évaluation de l'activité antioxydante. L'activité antioxydante d'un extrait est fonction de sa composition chimique notamment les composés phénoliques, les polysaccharides (Boudjeko *et al.*, 2013 ; Kannan *et al.*, 2015). Dans cette étude, les extraits brut et mycélien ont présenté de faibles activités dues à leurs faibles teneurs aux composés suscités. Les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II ont présenté les meilleures activités antioxydantes dues probablement à leurs teneurs plus élevées en composés phénoliques, en sucres totaux et à leur structure. En effet, tout comme les polyphénols de la famille des flavonoïdes, les polysaccharides sont constitués de nombreux groupements OH et donc, peuvent agir comme de potentiels donneurs d'hydrogène et induire la délocalisation des électrons dans la structure de la molécule et stabiliser la structure du radical (Soobrattee *et al.*, 2005 ; Shi *et al.*, 2013). Plus spécifiquement, les polysaccharides de type β-D-glucanes présentent de meilleures activités antioxydantes que les α-D-glucanes souvent rencontrés dans les exopolysaccharides (Gong *et al.*, 2020). Le pouvoir chélateur est un paramètre important de l'activité antioxydante car le fer est essentiel à la vie de par son

implication dans le transport de l'oxygène, la respiration et l'activité de plusieurs enzymes. Néanmoins, il accélère la peroxydation lipidique par la réaction de Fenton. Les pouvoirs chélateur et réducteur des métaux lourds observés chez GRP I et GRP II s'expliqueraient par la propriété que possèdent certains biopolymères comme les polysaccharides à former des complexes avec les métaux de transition ou à rompre la chaîne de radicaux libres par libération d'un atome d'hydrogène (Kadkhodace *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2015). En outre, la capacité de piégeage du radical NO \cdot des extraits GRP I et GRP II suggère que les polysaccharides inhiberaient la formation des ions nitrites. D'une manière générale, GRP I et GRP II ont présenté de meilleures activités anti radicalaires, chélatrice et réductrice du fer. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les polysaccharides de par leur structure sont plus aptes à libérer les protons pour réduire les radicaux libres que pour complexer les métaux (Amoussa *et al.*, 2015). GRP I et GRP II seraient donc de bons piègeurs d'ERO, prévenant et réparant par conséquent les dommages causés par ceux-ci dans l'organisme. Ces propriétés justifient le choix de ces extraits pour la détermination des activités antioxydantes *in vivo*.

Le stress oxydatif peut être causé par une exposition prolongée à certaines substances chimiques telles que les sucres. Le D-galactose est un sucre réducteur, capable de réagir à faible dose avec les molécules biologiques (réaction de Maillard ou glycation) pour former des complexes pro-oxydants. A concentration élevée dans l'organisme, le D-galactose s'oxyde en aldéhyde et peroxyde d'hydrogène (Vora *et al.*, 2009). Ainsi, l'induction d'un déséquilibre de la balance redox dû à la production des ERO et à une augmentation de la peroxydation lipidique a permis d'évaluer les teneurs en biomarqueurs du stress oxydant dans les homogénats, le plasma et l'hémolysât. Le D-galactose a entraîné une surproduction du taux de malondialdéhyde comparativement au groupe normal, témoignant de la richesse des membranes de certaines cellules (membranes plasmique, mitochondriale et lysosomale) en acides gras polyinsaturés qui sont des précurseurs de la peroxydation lipidique. Le malondialdéhyde (MDA) est le principal indicateur de la peroxydation lipidique survenant dans les tissus pouvant entraîner des dommages tissulaires, la mort cellulaire, le vieillissement précoce des cellules, l'inflammation et les cancers (Ayala *et al.*, 2014). L'extrait polysaccharidique GRP I à la dose de 125 mg/kg PC a provoqué une diminution significative ($p < 0,05$) des taux de MDA cérébral et hépatique chez les rats intoxiqués. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Jian-Hui *et al.* (2012) qui ont montré que les polysaccharides solubles du champignon *Cordyceps taii* réduisent significativement le taux de MDA chez les souris intoxiquées à 120 mg/kg PC de D-galactose. Le faible taux de MDA observé chez les groupes traités aux extraits polysaccharidiques s'expliquerait par la présence de

polysaccharides capables d'inhiber l'une des étapes de la peroxydation des lipides. Les extraits polysaccharidiques élimineraient également les hydroperoxydes suite à l'activation de la Glutathion peroxydase, enzyme inhibitrice de la peroxydation lipidique (Cillard *et al.*, 2006).

En outre, l'activité de la catalase augmente considérablement ($p < 0,05$) dans les groupes traités aux extraits polysaccharidiques à 125 mg/kg en comparaison au groupe contrôle négatif. Cependant, l'extrait polysaccharidique GRP I a présenté les meilleures activités soient $22,87 \pm 1,24$ et $17,55 \pm 0,39$ U/mg dans le cerveau et le foie respectivement. De même, GRP I et GRP II induisent une hausse significative ($p < 0,05$) de l'activité de la SOD avec un pic enregistré chez les animaux traités au GRP I dans le rein, le cerveau, et le foie précisément soient $15,07 \pm 0,95$; $14,47 \pm 0,98$ et $13,27 \pm 1,27$ U/mg. Dans le même ordre d'idée, Yanglin *et al.* (2012) ont montré que les polysaccharides solubles des carpophores de *Dictyophora indusiata* à la dose de 16,2 ml/kg boostent significativement l'activité des enzymes antioxydantes (catalase et SOD) chez les rats intoxiqués au D-galactose. Des résultats similaires ont été obtenus par Liu *et al.* (2012) qui ont mis en évidence le pouvoir antioxydant *in vivo* des polysaccharides intracellulaires solubles des extraits de *Hipsizigus marmoreus* grâce à leur habilité à augmenter significativement l'activité de la catalase et de la SOD dans les homogénats de foie, cœur, rein et le plasma sanguin à la concentration de 400 mg/kg PC. En effet, la catalase et la superoxyde dismutase sont des enzymes localisées dans des cellules comme les érythrocytes et les cellules des organes de détoxification (le foie et les reins). Ces enzymes constituent la première ligne dans le mécanisme de défense du système antioxydant endogène. L'accroissement de l'activité de la SOD traduirait l'habilité des polysaccharides à induire la réaction de dismutation des radicaux superoxydes en oxygène et peroxydes, lesquels sont transformés par la catalase. Cette dernière joue le rôle d'enzyme antioxydante par rupture de la liaison oxygène – oxygène du peroxyde d'hydrogène pour former l'eau et l'oxygène protégeant ainsi la cellule des dommages liés à la toxicité du H_2O_2 .

Les espèces réactives oxygénées peuvent également être générées par les cellules immunitaires comme les macrophages suite à une infection microbienne, en cas de tumeurs ou d'intoxication à certaines substances comme le D-galactose. En effet, lors d'une inflammation chronique, les mastocytes et leucocytes recrutés au site de l'infection synthétisent une quantité accrue de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, l'oxyde nitrique (Reuter *et al.*, 2010 ; Shi *et al.*, 2013 ; Wen *et al.*, 2016). L'intoxication au D-galactose a induit une surproduction d'oxyde nitrique par rapport au groupe normal. Tandis que les traitements à GRP I et GRP II induisent une baisse significative ($p < 0,05$) du taux

d'oxyde nitrique NO \cdot comparativement au groupe contrôle négatif. De résultats similaires ont été obtenus par Guerra Dore *et al.* 2007 qui ont montré que les polysaccharides solubles (β -glucane) du champignon *Geastrum saccatum* diminuent le taux d'oxyde nitrique chez les rats intoxiqués à la carrhagénine. L'oxyde nitrique (NO \cdot) est un radical libre produit par activation de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) neuronale (nNOS) ou endothéliale (eNOS) à partir de la L-Arginine et du NADPH au niveau des macrophages (Wen *et al.*, 2016). L'excès d'oxyde nitrique peut réagir avec de l'oxygène pour former du peroxyde nitrique (NOO \cdot), radical libre responsable de plusieurs dommages tissulaires. L'oxyde nitrique est impliqué dans les phénomènes biologiques tels que l'élimination des agents pathogènes, la vasodilatation, l'inhibition de l'adhérence et de l'agrégation des plaquettes et la neurotransmission (Oh *et al.*, 2008). Les polysaccharides exerceraient donc leur activité antioxydante également par inhibition des isoformes de l'oxyde nitrique synthase dans le rein, le cerveau et le foie.

III.1.6. Conclusion partielle 1

En somme, les extraits de *G. resinaceum* ont été obtenus à différents rendements selon la méthode employée. Ces extraits renferment une diversité de métabolites dont les plus abondants sont les polysaccharides. GRP I a présenté les meilleures activités anti-radicalaires DPPH et ABTS aux concentrations testées (25-200 μ g/mL). Cet extrait est également doté d'un pouvoir de chélation et de réduction des ions métaux et de piégeage de l'oxyde nitrique. De plus, à 125 mg/kg GRP I présente les meilleures activités antioxydantes *in vivo* en inhibant la peroxydation lipidique, augmentant l'activité enzymatique de la catalase et de la SOD comparativement aux animaux du groupe contrôle négatif. Les extraits polysaccharidiques des carpophores de *G. resinaceum* sont donc doués d'activités antioxydantes. Toutefois l'investigation d'autres activités biologiques en vue d'une éventuelle application thérapeutique est nécessaire.

III.2. Effets inhibiteurs des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur le processus inflammatoire

III.2.1. Effets protecteurs de la membrane des érythrocytes

Les effets des extraits de *G. resinaceum* et de l'ibuprofène vis à vis de l'hémolyse de la membrane des érythrocytes des rats sont illustrés à la figure 29. Il en ressort que tous les extraits possèdent la capacité à stabiliser la membrane des globules rouges de l'ordre de $1,48 \pm 1,13\%$ à $74,07 \pm 2,71\%$ aux concentrations testées (100-500 μ g/mL). Toutefois, l'activité minimale inhibitrice est observée avec l'extrait mycélien ($1,48 \pm 1,13\%$ à 100 μ g/mL). Tandis que, les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II présentent les pourcentages d'inhibition

les plus élevés soient $74,07 \pm 2,71$ et $69,46 \pm 5,16\%$ à $500 \mu\text{g/mL}$. Ces activités sont comparables à celle de l'ibuprofène, composé anti-inflammatoire de référence qui présente un pourcentage de $93,52 \pm 2,97\%$ à $500 \mu\text{g/mL}$.

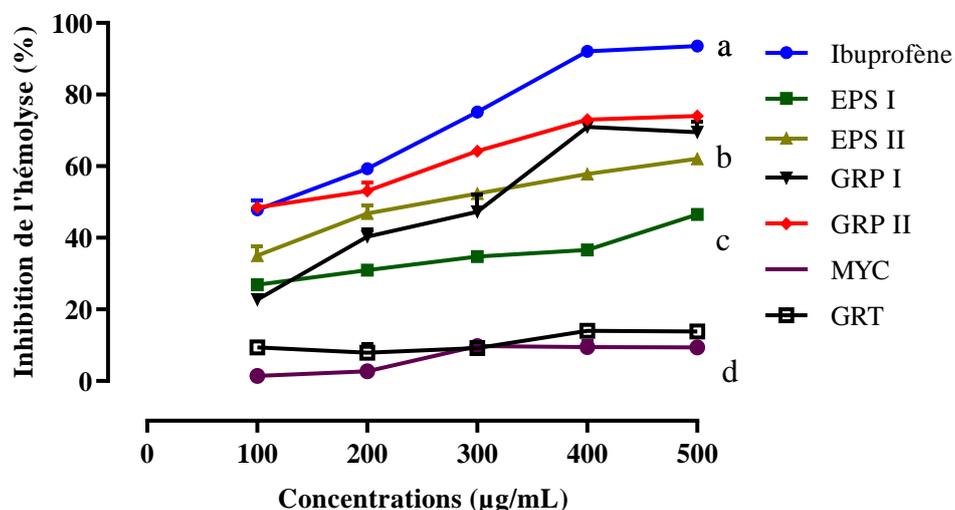


Figure 29 : Pourcentages d'inhibition de la membrane des érythrocytes par l'ibuprofène et les extraits de *G. resinaceum*.

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II :* extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC :* extrait mycélien et *GRT :* extrait brut de *G. resinaceum*. Différence significative $p < 0,05$ ($a > b > c > d$).

III.2.2. Effets inhibiteurs de la dénaturation des protéines

La figure 30 présente les effets des extraits de *G. resinaceum* sur la dénaturation de l'albumine d'œuf. Il en ressort que, les extraits mycélien et brut et présentent les activités les plus faibles, soient MYC ($13,20 \pm 2,80$ à $22,70 \pm 3,03\%$) et de GRT ($13,68 \pm 1,19$ à $22,49 \pm 2,81\%$) aux concentrations variant de 100 à $500 \mu\text{g/mL}$. Les extraits exopolysaccharidiques présentent des pourcentages d'inhibition variant de EPS I ($57,61 \pm 1,64$ à $59,34 \pm 1,41\%$) et EPS II ($57,69 \pm 0,21$ à $64,03 \pm 1,17\%$). Les extraits polysaccharidiques issus du carpophore naturel présentent les pourcentages d'inhibition les plus élevés, soient GRP I ($59,22 \pm 1,73$ à $60,94 \pm 2,92$) et de GRP II ($59,69 \pm 1,86$ à $60,25 \pm 2,25\%$) aux concentrations de 100 à $500 \mu\text{g/mL}$. Aucune différence significative n'a été observée entre les extraits issus du carpophore naturel et ceux issus de la fermentation mycélienne d'une part et entre l'extrait brut et l'extrait mycélien d'autre part. Toutefois, ces activités sont significativement ($p < 0,05$) inférieures à celles du standard (ibuprofène) aux concentrations testées, soient de $72,14 \pm 1,37$ à $74,17 \pm 1,32\%$.

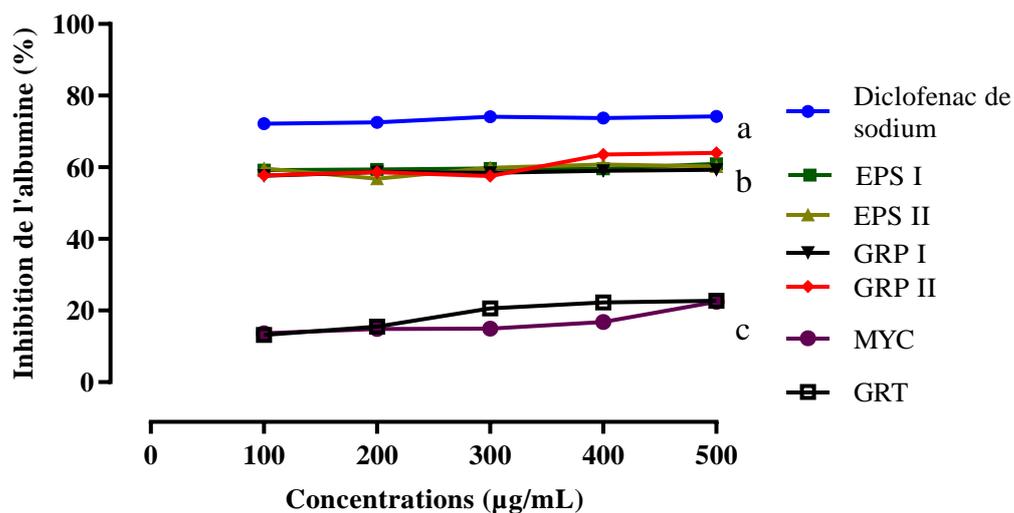


Figure 30 : Pourcentages d'inhibition de l'albumine de l'œuf par le diclofénac de sodium et les extraits de *G. resinaceum*.

EPS I et EPS II : extraits exopolysaccharidiques ; *GRP I et GRP II* : extraits polysaccharidiques des carpophores ; *MYC* : extrait mycélien et *GRT* : extrait brut de *G. resinaceum*. Différence significative $p < 0,05$ ($a > b > c$).

III.2.3. Effets inhibiteurs de l'inflammation aiguë chez un modèle expérimental de rats induits à la *k*-carraghénine

Les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II ayant présenté les meilleures activités anti-inflammatoires *in vitro* ont été retenues pour l'expérimentation *in vivo*.

L'administration d'une solution de *k*-carraghénine a provoqué un œdème de la peau de la patte arrière comparativement au groupe normal. Le prétraitement au diclofénac de sodium (20 mg/kg) et aux extraits de *G. resinaceum* (125 mg/kg) a inhibé de manière significative l'œdème formé dans la patte arrière, de manière dose dépendante 1, 3 et 5 heures après l'administration de la *k*-carraghénine en comparaison au groupe contrôle négatif (Tableau X). Toutefois, l'effet le plus prononcé était observé chez les animaux traités à GRP II après 3 heures ($96,3 \pm 2,95$ %) ($p < 0,001$), tandis que le diclofénac de sodium a induit une inhibition de $74,96 \pm 3,92$ % après 5 heures par rapport au groupe témoin négatif. La plus forte activité inhibitrice du GRP II a été confirmée par le plus faible diamètre ($4,54 \pm 0,60$ cm) de la patte arrière enregistré 3 h après injection de *k*-carraghénine ($p < 0,01$). Ces résultats suggèrent une activité anti-œdémateuse des extraits de *G. resinaceum* aux phases précoces et tardives de l'inflammation aiguë.

Tableau X : Effets des extraits de *G. resinaceum* et du diclofénac sodium (référence) sur l'œdème de la patte induit par la *k*-carraghénine chez les rats.

Durée (heures)	Diamètre de la patte arrière (cm)			
	0	1 h	3 h	5 h
Groupes	Inhibition de l'œdème (%)			
NOR	4,31 ± 0,46	4,29 ± 0,57**	4,35 ± 0,46**	4,34 ± 0,63*
CN	3,97 ± 0,16	5,28 ± 0,28 (0%)	5,63 ± 0,32 (0%)	5,14 ± 0,17 (0%)
CP	4,13 ± 0,10	5,21 ± 0,09 (24,53 ± 2,31%)	5,17 ± 0,28 (62,51 ± 5,27)	4,56 ± 0,19 (74,96 ± 3,92%)
GRP I	4,27 ± 0,41	5,07 ± 0,32** (52,1 ± 3,97%) ###	5,11 ± 0,50** (82,5 ± 5,10%) ###	4,54 ± 0,45* (91,1 ± 4,56%) ###
GRP II	4,21 ± 0,59	5,00 ± 0,57** (52,5 ± 3,46%) ###	4,91 ± 0,77** (96,3 ± 2,95%) ###	4,54 ± 0,6** (84,1 ± 2,66%) ###

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard. Les pourcentages d'inhibition sont mentionnés entre parenthèses, *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 par rapport au contrôle négatif. ###p < 0,001 ; ##p < 0,01 et #p < 0,05 par rapport au contrôle positif.

NOR : Contrôle normal ; **CN** : Contrôle négatif ; **CP** : Contrôle positif ; **GRP I et GRP II** : Extraits polysaccharidiques des carpophores de *G. resinaceum*.

II.2.3.1. Effets sur la microarchitecture du tissu sous plantaire

L'histomorphologie des tissus cutanés de la patte des groupes expérimentaux permet de révéler que les animaux du groupe normal présente une architecture normale soit un tissu conjonctif ferme riche en vaisseaux, des fibres de collagène, des élastines, de la substance fondamentale et une jonction dermo-épidermique séparant derme et épiderme. L'induction de la *k*-carraghénine a induit un œdème caractérisé par un tissu conjonctif lâche au niveau du derme profond avec une infiltration des cellules inflammatoires au foyer de lésion. Cette inflammation est suivie d'une dilatation des capillaires avec congestion gorgée des hématies. Les tissus cutanés des animaux traités au diclofénac de sodium (20 mg/kg) présentent un œdème modéré au niveau du derme profond suivi d'une faible infiltration leucocytaire ; une légère dilatation des capillaires avec atténuation des congestions. Tout comme les traitements au diclofénac de sodium à 20 mg/kg et à GRP I et GRP II (125 mg/kg) provoquent une restauration quasi normale de la microarchitecture des tissus cutanés caractérisés un léger infiltrat leucocytaire pré-vasculaire avec une dilatation atténuée des capillaires (Figure 31).

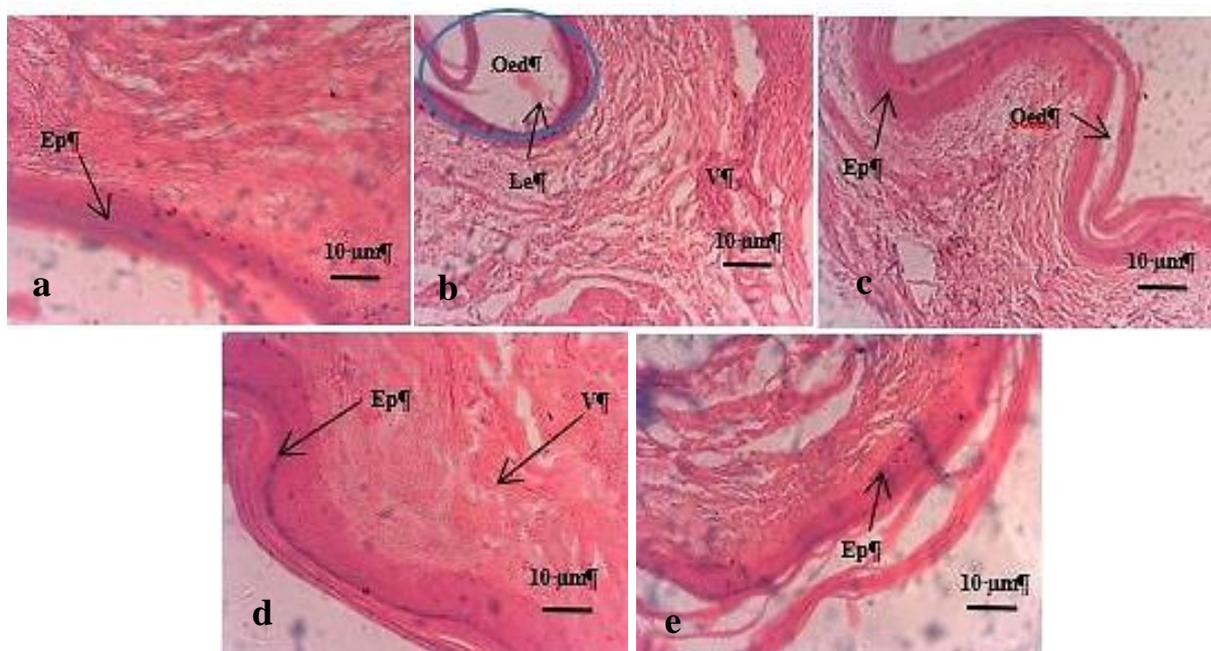


Figure 31 : Photomicrographies des tissus cutanés de la patte arrière gauche des animaux expérimentaux (HE \times 400).

a : Contrôle normal (animaux ayant reçu uniquement NaCl 0,9% p.o) ; *b : Contrôle négatif* (animaux ayant reçu 100 μ L de solution de *k*-carraghénine 1% + NaCl 0,9% i.p) ; *c : Contrôle positif* (animaux ayant reçu le diclofénac de sodium à 20 mg/kg + NaCl 0,9% p.o) ; *d, e* : animaux ayant reçu les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II à la dose 125 mg/kg + NaCl 0,9% p.o) ; **Ep** : Epiderme ; **Le** : Leucocytes ; **Oe** : œdème ; **V** : Vaisseaux congestionnés gorgés en hématies.

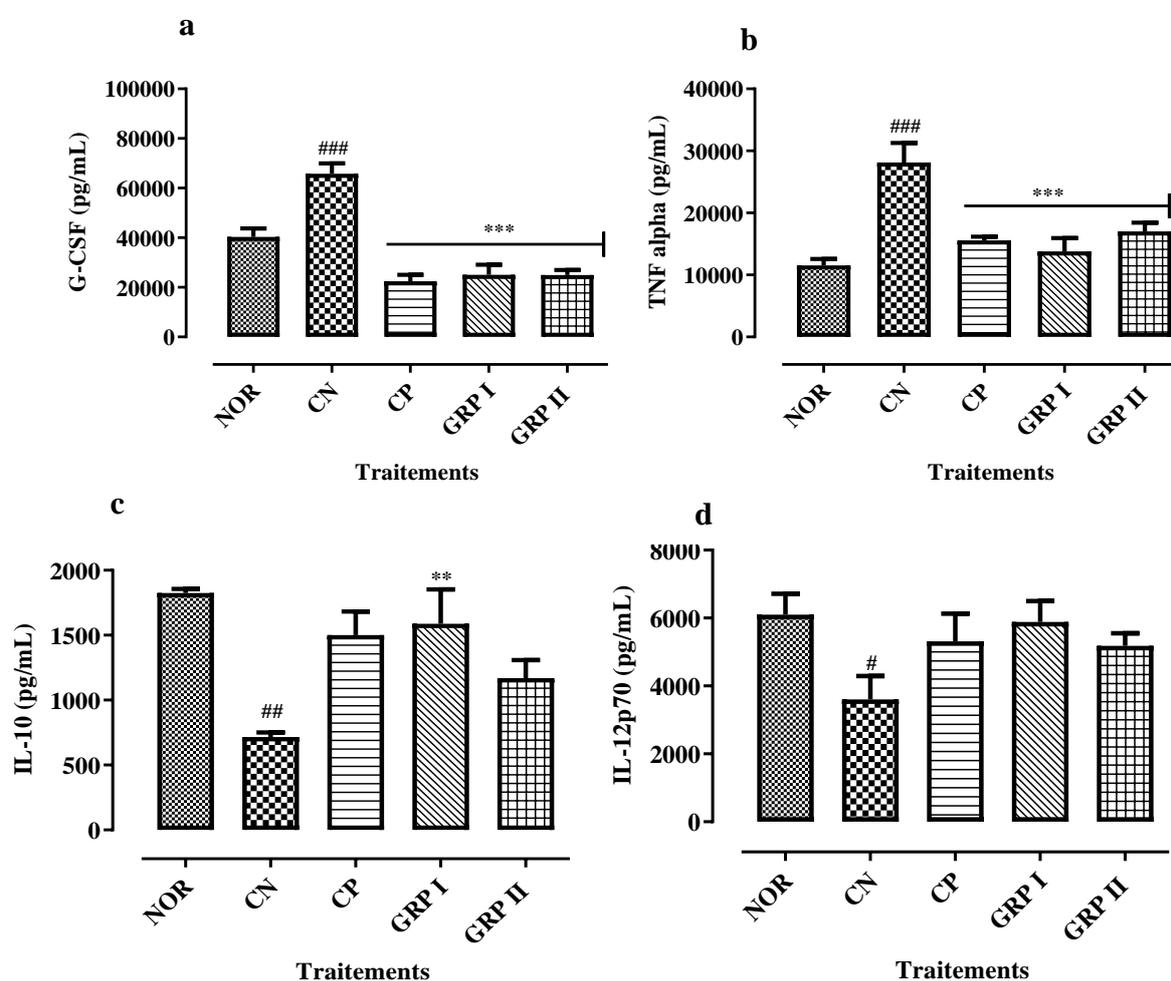
II.2.3.3. Effets sur le taux de cytokines et des chimiokines

L'induction de la *k*-carraghénine a induit une augmentation significative des taux sériques de quelques cytokines pro-inflammatoires (G-CSF et TNF- α) comparativement au groupe normal ($p < 0,001$). En revanche, le diclofénac de sodium à la dose de 20 mg/kg a induit une diminution significative des taux sériques de G-CSF et TNF- α soient respectivement $22489,32 \pm 5798,16$ et $15778,00 \pm 1347,54$ pg/mL ($p < 0,001$) comparés au groupe contrôle négatif. De même, les traitements des animaux aux extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* à la dose de 125 mg/kg ont induit une baisse significative ($p < 0,001$) des taux de G-CSF [GRP I : $25000 \pm 8164,97$ pg/mL ; GRP II : $24941,28 \pm 4084,17$ pg/mL] et TNF- α [GRP I : $15854,2133 \pm 1479,54$ pg/mL ; GRP II : $15694,54 \pm 1202,98$ pg/mL] en comparaison au groupe contrôle négatif (Figure 32 a, b).

D'autre part, l'administration de la *k*-carraghénine a induit une baisse significative des taux sériques de cytokines anti-inflammatoires : IL-10 ($p < 0,05$) et IL-12p70 ($p < 0,001$) en comparaison au contrôle normal. Toutefois, le diclofénac de sodium à 20 mg/kg a provoqué une augmentation significative ($p < 0,001$) des taux sériques de l'IL-10 et de l'IL-12p70

comparativement au contrôle négatif. Des effets similaires ont été observés chez les animaux traités aux extraits de *G. resinaceum* à la dose de 125 mg/kg avec des teneurs d'IL-10 de [GRP I : $1587,77 \pm 530,85$ pg/mL ($p < 0,01$) ; $1170,13 \pm 277,63$ pg/mL] et d'IL-12p70 [GRP I : $6018,28 \pm 1463,29$ pg/mL] ; GRP II : $5016,70 \pm 822,99$ pg/mL] (Figure 32 c, d).

La *k*-carraghénine a induit également une baisse significative des taux sériques de l'éotaxine ($p < 0,05$) et de la fractalkine ($p < 0,01$) comparativement au groupe normal. Cependant, tout comme le diclofénac de sodium (20 mg/kg) les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont induit une hausse significative du taux d'éotaxine [GRP I : $25957,00 \pm 3210,85$ pg/mL ($p < 0,01$) ; GRP II : $25414,33 \pm 2374,85$ pg/mL ($p < 0,01$)] et de fractalkine [GRP I : $603,84 \pm 66,92$ pg/mL ; GRP II : $1908,45 \pm 296,96$ pg/mL] comparativement au contrôle négatif (Figure 32 e, f).



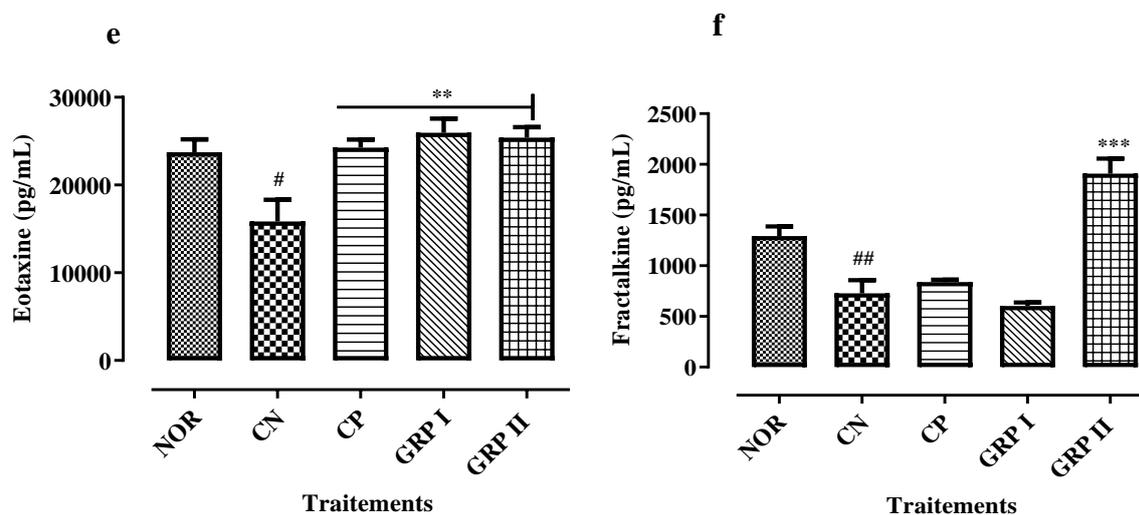


Figure 32 : Effets des extraits de *G. resinaceum* (125 mg/kg) et du diclofénac de sodium (20 mg/kg) sur la production des cytokines et des chimiokines sériques.

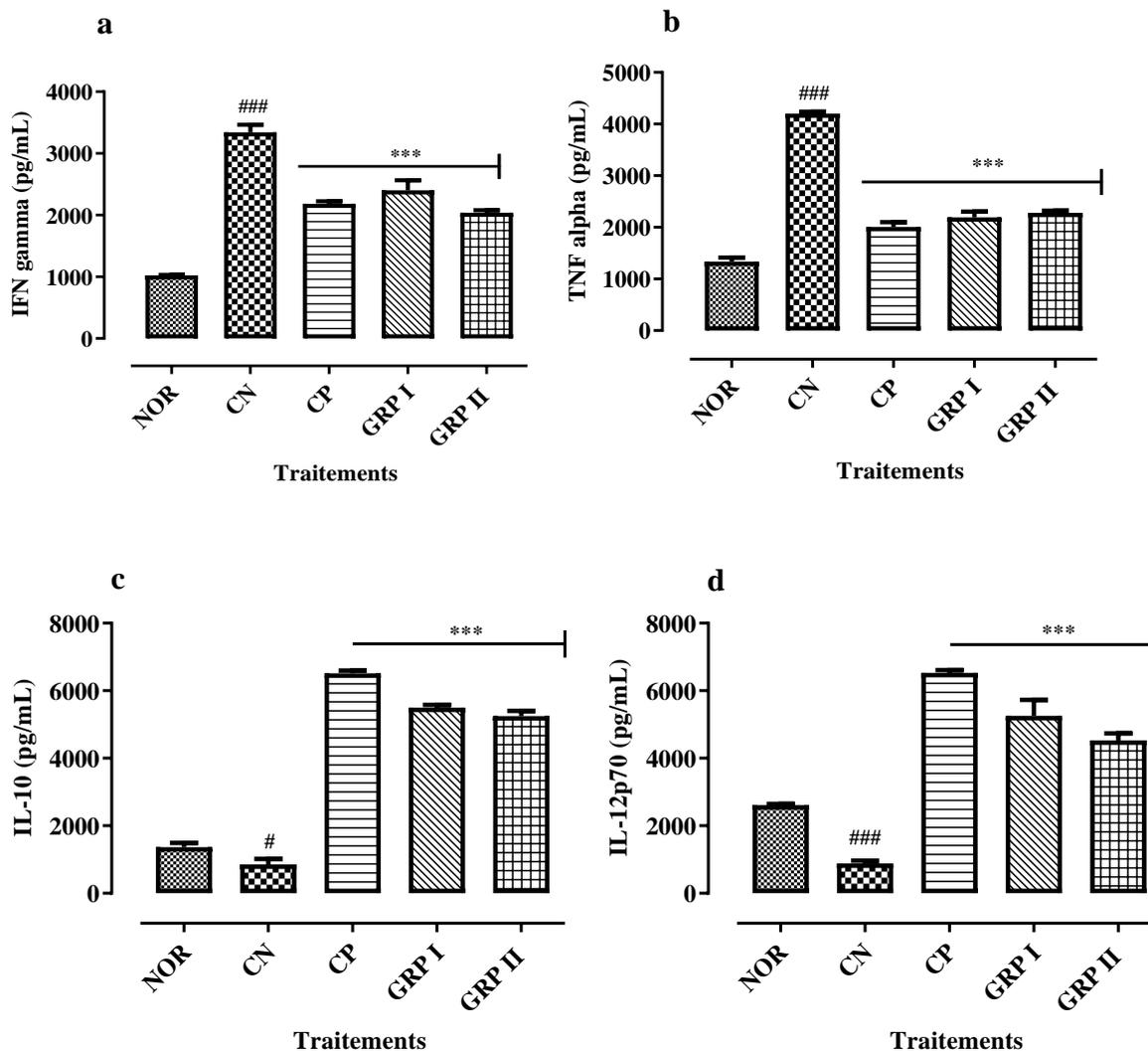
(a) **G-CSF:** *Growth Colony Stimulating Factor*; (b) **TNF- α :** *Tumor Necrosis Factor alpha*, (c) **IL-10:** Interleukine-10, (d) **IL-12p70:** Interleukine-12p70; (e) Eotaxine; (f) Fractalkine. Les concentrations de cytokine/chimiokine sont représentées sous forme de moyenne \pm ESM (n = 5). ####p < 0,001 ##p < 0,01 comparé au groupe normal, #p < 0,05 comparé au groupe normal, *p < 0,05 comparé au contrôle négatif, **p < 0,01 comparé au contrôle négatif, ***p < 0,001 comparé au contrôle négatif.

Les effets du diclofénac de sodium (20 mg/kg) et des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* (125 mg/kg) sur les taux des cytokines et des chimiokines dans le tissu sous cutané de la patte gauche des rats sont illustrés à la figure 33. Il en ressort que l'administration de la *k*-carraghénine a induit une augmentation significative des concentrations en cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α) en comparaison au groupe normal (p < 0,001). Tandis que, le traitement au diclofénac de sodium (20 mg/kg) provoque une réduction significative des taux d'IFN- γ et de TNF- α (p < 0,001) comparativement au groupe contrôle négatif. Tout comme le diclofénac de sodium, les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont induit une diminution significative (p < 0,001) des taux d'IFN- γ [GRP I : 2038,03 \pm 81,65 pg/mL ; GRP II : 3238,47 \pm 31,03 pg/mL] et de TNF- α [GRP I : 2279,08 \pm 81,65 pg/mL ; GRP II : 1311,93 \pm 215,40 pg/mL] en comparaison au groupe contrôle négatif (Figure 32 a, b).

L'administration de la *k*-carraghénine a entraîné une réduction significative des concentrations en IL-10 (p < 0,05) et en IL-12p70 (p < 0,001) en comparaison au groupe normal. Tandis que le diclofénac de sodium (20 mg/kg) a induit une hausse significative des concentrations en IL-10 [GRP I : 5250 \pm 300 pg/mL ; GRP II : 4500 \pm 326,60 pg/mL] et en IL-12p70 [GRP I : 4530,01 \pm 408,25 pg/mL ; GRP II : 3865,84 \pm 163,30 pg/mL] (p < 0,001) comparativement au groupe contrôle négatif (Figure 33 c, d).

De plus, la *k*-carraghénine entraîne une diminution significative des concentrations en éotaxine (p < 0,001) et en fractalkine (p < 0,05) comparativement au groupe normal. Par

contre, le diclofénac de sodium (20 mg/kg) a provoqué une hausse significative des taux d'éotaxine et de fractalkine ($p < 0,001$) en comparaison au groupe contrôle négatif. Les extraits polysaccharidiques ont également induit une hausse significative des taux d'éotaxine [GRP I : $22841 \pm 816,50$ pg/mL ($p < 0,001$) ; GRP II : $831,14 \pm 25,31$ pg/mL ($p < 0,001$)] et de fractalkine [GRP I : $26742,47 \pm 2449,49$ pg/mL ($p < 0,001$) ; GRP II : $992,14 \pm 56,79$ pg/mL] comparativement au groupe contrôle négatif (Figure 33 e, f).



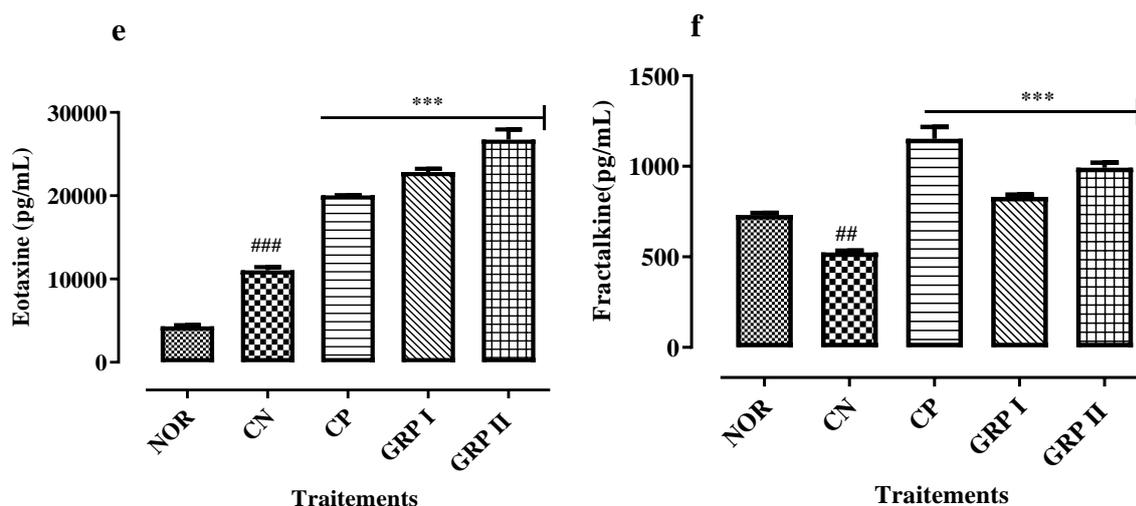


Figure 33 : Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* (125 mg/kg) et du diclofénac de sodium (20 mg/kg) sur la production des cytokines et des chimiokines dans le tissu sous cutané.

(a) **IFN- γ** : Interferon- γ ; (b) **TNF- α** : *Tumor Necrosis Factor alpha*, (c) **IL-10** : Interleukine-10, (d) **IL-12p70** : Interleukine-12p70 ; (e) Eotaxine ; (f) Fractalkine. Les concentrations de Cytokine/chimiokine sont représentées sous forme de moyenne \pm ESM (n =5). ### $p < 0,001$ ## $p < 0,01$ comparé au groupe normal, # $p < 0,05$ comparé au groupe normal, * $p < 0,05$ comparé au contrôle négatif, ** $p < 0,01$ comparé au contrôle négatif, *** $p < 0,001$ comparé au contrôle négatif.

III.2.4. Discussion partielle 2

L'inflammation de par son rôle dans la défense de l'organisme contre les stimuli endogènes ou exogènes constitue le point de départ du processus de traitement. L'utilisation des médicaments antalgiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), stéroïdiens (AIS) et opioïdes est fortement recommandée pour y faire face. Cependant, ces derniers provoquent des effets délétères sur la santé humaine à long terme (Emran *et al.*, 2015). Par conséquent, un intérêt majeur est porté sur des thérapies alternatives à base des produits naturels. Dans cette étude, nous avons investigué les activités anti-inflammatoires des extraits de *G. resinaceum in vitro* par les tests de stabilisation de la membrane et de dénaturation des protéines. Les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II ont présenté de meilleurs effets protecteurs de la membrane des érythrocytes avec des pourcentages d'inhibition de l'hémolyse de $74,07 \pm 2,71$ et de $69,46 \pm 5,16\%$ à $500 \mu\text{g/mL}$. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Varghese *et al.* (2013) qui ont montré que l'extrait polysaccharidique soluble d'*Eurycoma longifolia* a une activité hémolytique dose-dépendante vis-à-vis de la membrane des érythrocytes humains aux concentrations 25 ; 50 ; 100 ; 250 et $500 \mu\text{g/mL}$. En effet, l'intégrité de la membrane plasmique est inextricablement liée à la viabilité cellulaire. Une exposition à des substances telles que la phénylhydrazine ou le méthylsalicylate, à une solution hémolytique ou à la

chaleur entraîne une oxydation de l'hémoglobine et une hémolyse (Mounnissamy *et al.*, 2008). L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à l'accumulation excessive de fluide dans la cellule conduisant à la rupture de sa membrane. De plus, la déformabilité et le volume cellulaire des érythrocytes dépendent de la concentration intracellulaire en calcium. L'effet protecteur des extraits polysaccharidiques peut être due à une modification de l'afflux de calcium dans les érythrocytes (Chopade *et al.*, 2012). Les membranes des érythrocytes et des lysosomes étant structurellement semblables, la capacité de stabiliser la membrane des érythrocytes peut également aider à protéger celle des lysosomes. Ce mécanisme empêche la libération des protéines sériques dans les tissus pouvant activer les neutrophiles et prolonger la réaction inflammatoire (Anosike *et al.*, 2012).

L'activation incontrôlée ou prolongée de l'inflammation peut provoquer des altérations dangereuses, telles que la dénaturation des protéines qui produit des auto-antigènes. Ces derniers sont associés à une réaction d'hypersensibilité de type III, des maladies auto-immunes comme des polyarthrites rhumatoïdes et l'arthrite. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (Arya et Patni, 2013). Une forte activité inhibitrice des protéines des extraits polysaccharidiques GRPI et GRP II a été relevée dans cette étude soient respectivement $60,94 \pm 2,92$ et $60,25 \pm 2,25\%$ à 500 $\mu\text{g/mL}$. Ceci pourrait s'expliquer par l'interaction de certains composants avec deux sites présents au niveau de certaines protéines comme l'ovalbumine de liaisons riches en tyrosine, thréonine et lysine (Williams *et al.*, 2008). Les polysaccharides de *G. resinaceum* seraient donc capables de contrôler la production d'auto-antigènes par l'inhibition de la dénaturation des protéines.

L'induction de l'œdème par la *k*-carraghénine dans la patte d'un rongeur est un modèle clairement établi d'étude des activités anti inflammatoires *in vivo* des produits naturels ou synthétiques. En effet, la carraghénine est un agent phlogogène dont l'administration entraîne une réaction inflammatoire biphasique. La phase initiale ou précoce dure 01 h 30 min après injection de la *k*-carraghénine et elle est caractérisée par la libération de l'histamine, la sérotonine et la bradykinine. La phase tardive peut s'étendre jusqu'à 05 h après injection de la carraghénine et est caractérisée par l'infiltration des neutrophiles et la libération de la prostaglandine médiée par les cyclooxygénases. Ces médiateurs augmentent la perméabilité capillaire ; il se forme ainsi un exsudat responsable de l'œdème qui comprime les nerfs et provoque la sensation de douleur (Florentino *et al.*, 2017). Dans cette expérimentation, tout comme le diclofénac de sodium, les extraits de *G. resinaceum* à la dose de 125 mg/kg ont

provoqué une diminution significative de l'œdème comparativement au groupe contrôle négatif. Cependant, l'extrait GRP II a présenté une très forte activité anti-œdémateuse soit un pourcentage d'inhibition de $96,3 \pm 2,95 \%$ 03 h après injection de la *k*-carraghénine. Des résultats concordants ont été obtenus par Sousa *et al.* (2018) qui ont révélé qu'à la dose de 10 mg/kg les hétéropolysaccharides de *Morinda citrifolia* constitués principalement d'homogalacturonane et de rhamnogalacturonane présentent une activité anti-œdémateuse.

L'étude histologique révèle que l'induction de la *k*-carraghénine a provoqué une inflammation aigüe caractérisée par un œdème qui se traduit microscopiquement par un aspect pâle, peu colorable et distendu du tissu conjonctif. Le diclofénac de sodium à 20 mg/kg a prévenu l'apparition de la congestion tissulaire, en diminuant l'intensité de l'infiltrat et la réduction de la taille des follicules. Chez les animaux traités aux extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*, il y a une phase de réparation qui se traduit par des néovaisseaux sanguins à la surface des lésions.

La phase tardive de l'inflammation aigüe est également marquée par une production des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines dans le sérum et le tissu sous cutané. Ainsi, l'induction de la *k*-carraghénine a induit une surproduction des cytokines pro-inflammatoires (G-CSF, TNF- α) et une réduction significative du taux de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-12p70) et des chimiokines (éotaxine et fractalkine) en comparaison au groupe normal. Toutefois, le diclofénac de sodium et les extraits de *G. resinaceum* ont entraîné une baisse significative des taux de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines et une augmentation significative du taux de cytokines anti-inflammatoires en comparaison au groupe contrôle négatif. Plusieurs auteurs ont mis en exergue les propriétés anti-inflammatoires des composés bioactifs des plantes médicinales à l'instar du diallyldisulfure (DADS), composé organosulfuré isolé de l'ail qui inhibe le développement de l'œdème chez les souris en réduisant significativement les taux de CRP, de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-2. DADS inhibe également le taux de chimiokines et donc l'infiltration et la migration des macrophages et des leucocytes au site de lésion. L'acide bétulinique réduit significativement les taux sériques de l'IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, GM-CSF, KC, MCP-1 et PGE2 et augmentent ceux d'IL 10 et IL-12 chez les souris. La vinpocétine réduit significativement les douleurs inflammatoires en régulant le stress oxydatif, la production de cytokines pro-inflammatoires par la voie NF κ -B chez les souris (Ruiz-Miyazawa *et al.*, 2015 ; Ou *et al.*, 2019 ; Zhang *et al.*, 2020). Les cytokines pro-inflammatoires (G-CSF, TNF- α , IL-1 β , IL-2...) sont produites par les cellules immunitaires (macrophages, monocytes) et non immunitaires (fibroblastes, cellules endothéliales) en réponse à une attaque tissulaire (Copravay *et al.*, 2001). TNF- α stimule la

sécrétion de G-CSF, d'IL-1 β , des kinines et des leucotriènes qui régulent et contrôlent la nociception durant la phase tardive. TNF- α est également impliqué dans la régulation des autres cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion à la surface des neutrophiles, des cellules endothéliales, l'activation et le chimiotactisme des leucocytes (Cha *et al.*, 2011). Le chimiotactisme des cellules immunitaires au site de l'inflammation est assuré à travers les chimiokines telles que l'éotaxine et la fractalkine. Ainsi, chez les animaux des groupes GRP I et GRP II, le faible taux d'éotaxine dans le sérum et le tissu sous-cutané traduit une faible infiltration des éosinophiles au site de l'inflammation. Ces cellules sont capables de produire des espèces réactives oxygénées, des cytokines pro-inflammatoires, et des protéines granulaires à fort potentiel cytotoxique. De même, la fractalkine est un chémoattractant des monocytes, des lymphocytes T et cellules tueuses sous l'induction des cytokines pro inflammatoires (Jones *et al.*, 2012). Ces activités anti inflammatoires sont plus importantes chez les groupes traités aux extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II. Ces résultats suggèrent que les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* exerceraient leurs activités anti-inflammatoires *in vivo* en inhibant la synthèse des prostaglandines, des enzymes lysosomales, en régulant les taux de cytokines et de chimiokines empêchant ainsi une invasion massive des cellules immunitaires au site de l'inflammation.

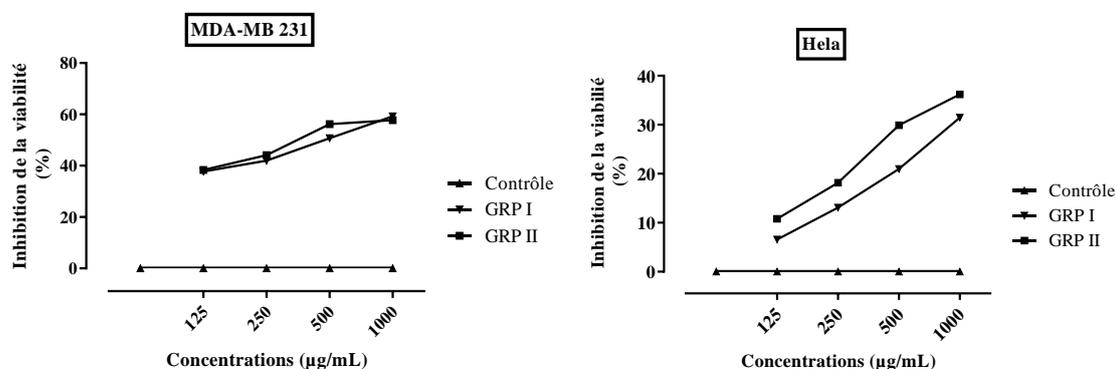
III.2.5. Conclusion partielle 2

La présente partie consistait à évaluer les activités anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* des extraits de *G. resinaceum*. Il en ressort que tous les extraits de *G. resinaceum* possèdent des effets protecteurs de la membrane des érythrocytes murins et inhibiteurs de la dénaturation des protéines aux concentrations de 100 à 500 $\mu\text{g/mL}$. De plus à la dose de 125 mg/kg, GRP I et GRP II ont la capacité de réduire le développement de l'œdème induit par injection de la *k*-carraghénine dans la patte postérieure gauche de l'animal. Cette activité anti-œdémateuse a été confirmée par une microarchitecture quasi normale et une faible infiltration des cellules immunitaires dans les tissus sous-cutanés des animaux des groupes tests. Sur le plan biochimique, les extraits inhibent significativement la surproduction des cytokines pro-inflammatoires (G-CSF, TNF- α), des chimiokines (éotaxine, fractalkine) et augmentent significativement les taux de cytokines anti-inflammatoires (IL 10, IL 12p70). Toutefois les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II présentent les meilleures activités anti-inflammatoires et pourraient être exploitées dans une stratégie de thérapie contre les maladies inflammatoires et des cancers.

III.3. Effets cytotoxiques et chimiopréventifs des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* contre l'hépatocarcinome induit au N-diéthylnitrosamine chez les rats Wistar

III. 3.1. Effets cytotoxiques

La cytotoxicité des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* (GRP I et GRP II) a été étudiée par le test de viabilité cellulaire au MTT sur les lignées de cellules cancéreuses MDA MB 231, Hela et HepG₂. Il en ressort que ces cellules ont présenté un pourcentage de viabilité cellulaire de 100% soit une inhibition de 0% en absence d'extrait. Cependant, les extraits polysaccharidiques ont affecté la viabilité des cellules cancéreuses de façon dose-dépendante aux concentrations testées. À 125 µg/mL, les pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire sont respectivement de [GRP I : 37,7 ± 0,22 ; 6,62 ± 2,96 ; 8,79 ± 4,40%] et de [GRP II : 38,33 ± 6,13 ; 10,77 ± 2,23 ; 12,68 ± 7,41%] vis à vis de MDA MB 231, Hela et HepG₂. À 250 µg/mL, les pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire sont respectivement de [GRP I : 41,97 ± 2,92 ; 13,08 ± 4,70 ; 19,91 ± 4,45%] et de [GRP II : 44,13 ± 1,81 ; 18,17 ± 2,65 ; 25,36 ± 4,72%] vis à vis de MDA MB 231, Hela et HepG₂. À 500 µg/mL, les pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire sont respectivement de [GRP I : 59,67 ± 6,18 ; 20,98 ± 2,93 ; 26,95 ± 6,19%] et de [GRP II : 56,22 ± 2,88 ; 29,92 ± 0,37 ; 40,38 ± 2,26%] vis à vis de MDA MB 231, Hela et HepG₂. À 1000 µg/mL, les pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire sont respectivement de [GRP I : 59,24 ± 5,75 ; 31,45 ± 0,70 ; 36,85 ± 5,30%] et de [GRP II : 57,72 ± 0,11 ; 36,20 ± 3,12 ; 41,50 ± 1,55%] vis à vis de MDA MB 231, Hela et HepG₂. (Figure 34). D'une manière générale, GRP II a présenté une meilleure cytotoxicité avec un effet plus prononcé sur les cellules HepG₂ soit une CC₅₀ de 261,7 µg/mL (Tableau XI). L'acide gallique utilisé comme standard présente un pourcentage moyen d'inhibition cellulaire de 87,03 ± 2,5% à 500 µg/mL.



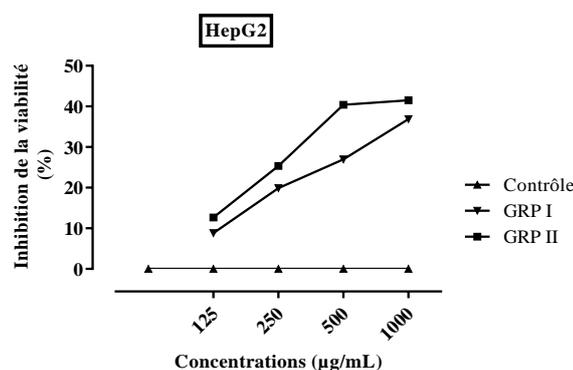


Figure 34 : Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur la viabilité de quelques cellules tumorales.

Tableau XI : Cytotoxicité des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

	CC ₅₀ (µg/mL)	
	GRP I	GRP II
MDA MB 231	420,3	298,0
Hela	407,8	341,1
HepG ₂	340,0	261,7

CC₅₀: concentration des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* réduisant la viabilité cellulaire de 50%. Les cellules MDA MB 231, Hela et HepG₂ ont été exposées aux extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* aux concentrations 125, 250 et 500 µg/mL pendant 48 h.

III.3.2. Effets chimiopréventifs des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* contre l'hépatocarcinome induit au N-diéthylnitrosamine chez les rats Wistar

III.3.2.1. Effets des extraits polysaccharidiques sur l'évolution pondérale des animaux

L'évolution pondérale des animaux au cours de 12 semaines d'expérimentation est illustrée à la figure 35. Tous les traitements ont affecté la charge pondérale durant l'expérimentation. L'administration du DEN a induit une baisse significative ($p < 0,001$) de la charge pondérale en comparaison au groupe NOR dès la 9^{ème} semaine d'expérimentation. Cependant, les animaux du groupe traités à la doxorubicine et aux extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) présentent des charges pondérales significativement inférieures ($p < 0,001$) en comparaison à ceux du groupe DEN dès la 8^{ème} semaine d'expérimentation.

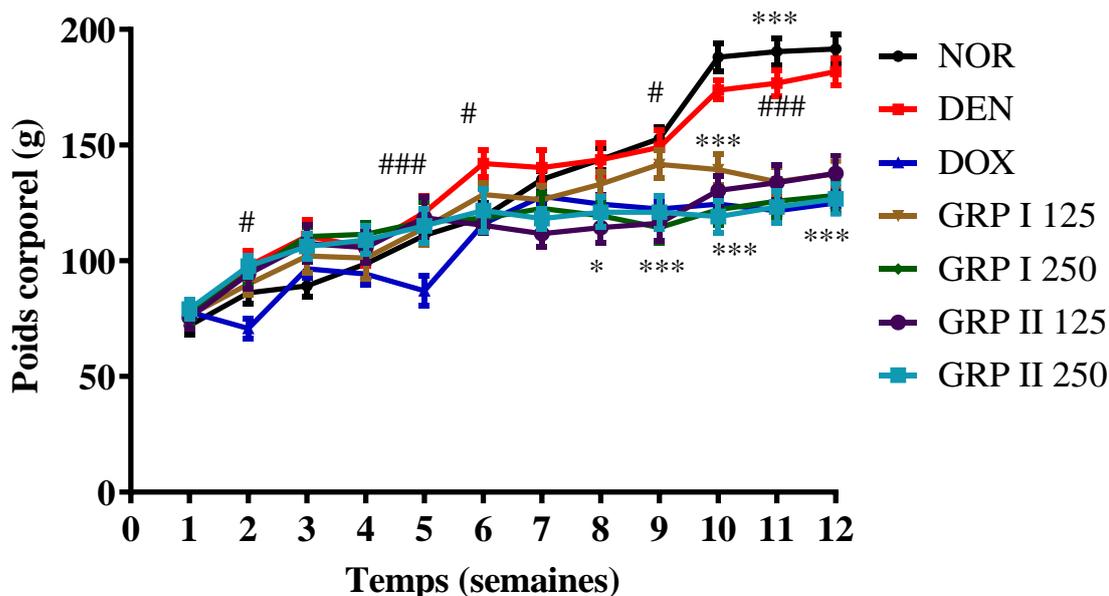


Figure 35 : Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur l'évolution pondérale des animaux après 12 semaines d'expérimentation.

NOR = Groupe normal (animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; **DEN** = contrôle négatif (animaux ayant reçu le N-diéthylnitrosamine + solution saline 0,9%) ; **DOX** = Contrôle positif (Animaux ayant reçu la doxorubicine + N-diéthylnitrosamine) ; **GRP I** = animaux ayant reçu GRP I + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg ; **GRP II** = animaux ayant reçu GRP II + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg. Les points désignent les moyennes \pm ESM (n=9). Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe Normal (NOR) ont été exposés au N-diéthylnitrosamine (100 mg/kg) pendant 10 semaines. ###p < 0,001, ##p < 0,01 comparés au groupe normal, #p < 0,05 comparés au groupe normal, *p < 0,05 comparés au groupe contrôle négatif, **p < 0,01 comparés au groupe contrôle négatif, ***p < 0,001 comparés au groupe contrôle négatif.

III.3.2.2. Effets des extraits polysaccharidiques sur l'incidence des décès animaux

Le taux de survie des animaux durant l'expérimentation a été déterminé selon la méthode probabiliste de Kaplan Meir (Figure 36). Les animaux du groupe normal présentent un taux de survie global de 85% avec une apparition de décès à la 10^{ème} semaine. Cependant, un fort taux de mortalité est enregistré chez les animaux du groupe DEN soit un taux de survie de 30%. Les animaux des groupes DOX, GRP I 125, GRP I 250, GRP II 125 et GRP II 250 présentent des taux de survie de 65%, 55%, 40%, 65% et 45% respectivement.

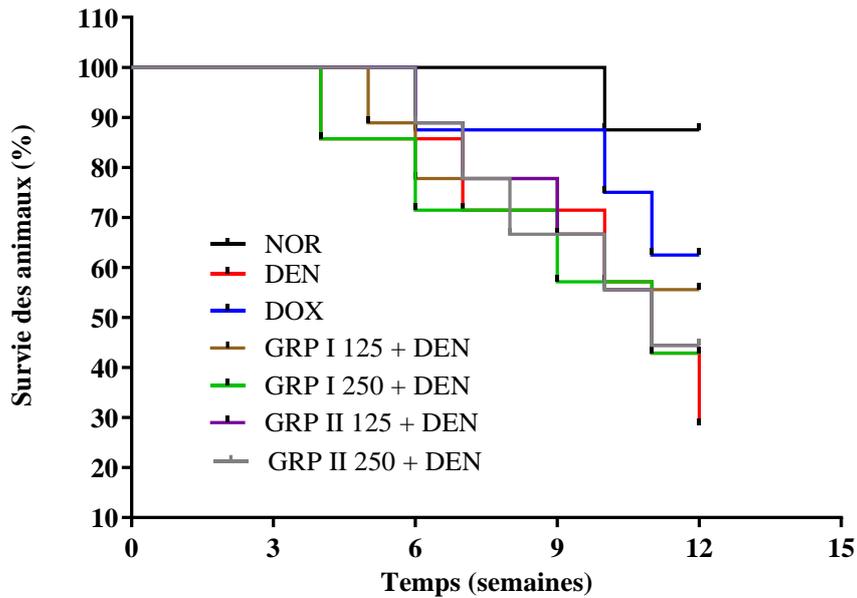


Figure 36: Courbe de survie de Kaplan Meir après 12 semaines d'expérimentation.

NOR = Groupe normal (animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; *DEN* = contrôle négatif (animaux ayant reçu le N-diéthylnitrosamine + solution saline 0,9%) ; *DOX* = Contrôle positif (Animaux ayant reçu la doxorubicine + N-diéthylnitrosamine) ; *GRP I* = animaux ayant reçu GRP I + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg ; *GRP II* = animaux ayant reçu GRP II + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg. Les points désignent les moyennes \pm ESM (n=9). Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe Normal (*NOR*) ont été exposés au N-diéthylnitrosamine (100 mg/kg) pendant 10 semaines.

III.3.2.3. Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur la microarchitecture du foie des animaux

L'analyse histomorphologique de l'espace porte hépatique des rats permet d'observer une microarchitecture normale dans le groupe normal avec des cellules hépatiques à cytoplasme granulé, un canal biliaire, une veine porte, une artère hépatique et un noyau uniforme bien différenciés (Figure 37 a). Par contre, l'espace porte hépatique des animaux traités au DEN ont présenté une infiltration massive des cellules inflammatoires (leucocytes, les cellules de Kupffer) (Figure 37 b).

Comparativement au groupe DEN, la doxorubicine, GRP I et GRP II à 125 et 250 mg/kg protègent les tissus hépatiques se traduisant par une très faible infiltration des cellules inflammatoires dans l'espace porte et un aspect normal des hépatocytes (Figure 37 c-g).

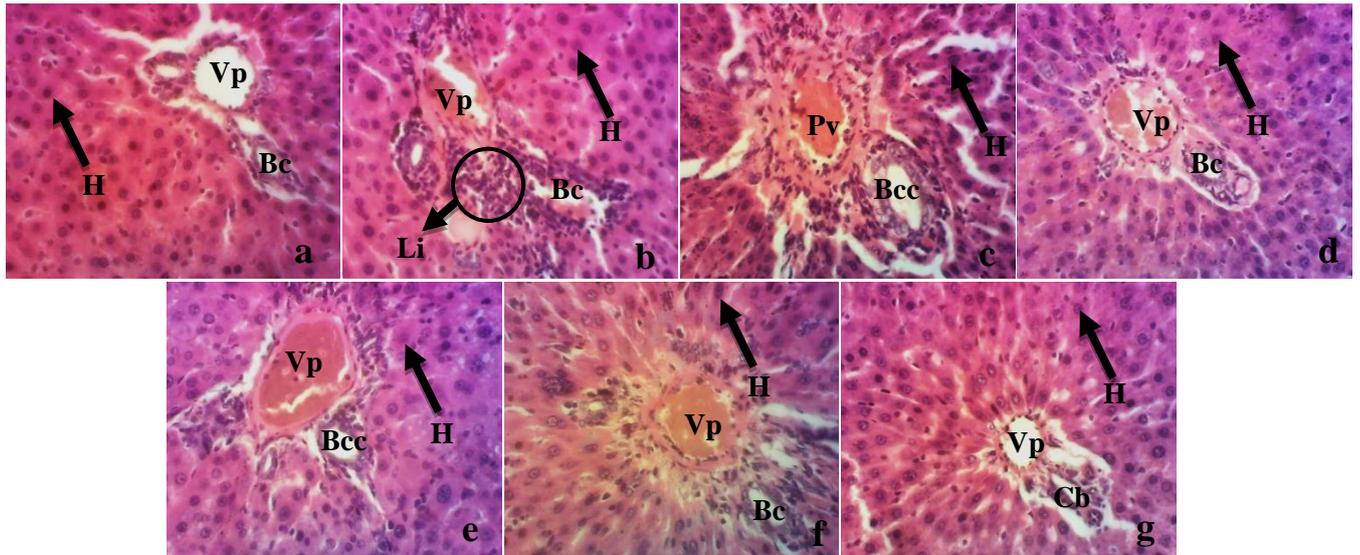


Figure 37 : Photomicrographies de l'espace porte hépatique des différents groupes expérimentaux après 12 semaines de traitement (X200, H-E).

a : Groupe normal ; *b* : Contrôle négatif ; *c* : Animaux ayant reçu la doxorubicine + N-diéthylnitrosamine ; *d* : Animaux ayant reçu GRP I + N-diéthylnitrosamine à 125 mg/kg; *e* : Animaux ayant reçu GRP I + N-diéthylnitrosamine à 250 mg/kg; *f* : Animaux ayant reçu GRP II + N-diéthylnitrosamine à 125 mg/kg; *g* : Animaux ayant reçu GRP II + N-diéthylnitrosamine à 250 mg/kg ;

H : Hépatocytes ; **Cb** : Canaux biliaires, **Vp** : Veine porte, **Li** : Inflammation leucocytaire.

Ces résultats ont été confirmés par le nombre moyen de veines porte présentant une infiltration de cellules immunitaires. Le groupe normal ne présente aucune infiltration de leucocytes. En revanche, le groupe témoin négatif présente 04 veines porte avec infiltration de cellules immunitaires. Les groupes traités par DOX, GRP I et GRP II à 125 et 250 mg/kg présentent respectivement en moyenne 0,67 ; 1,67 ; 2,67 ; 1,00 et 3,33 veines porte avec des infiltrations de cellules immunitaires (Figure 38).

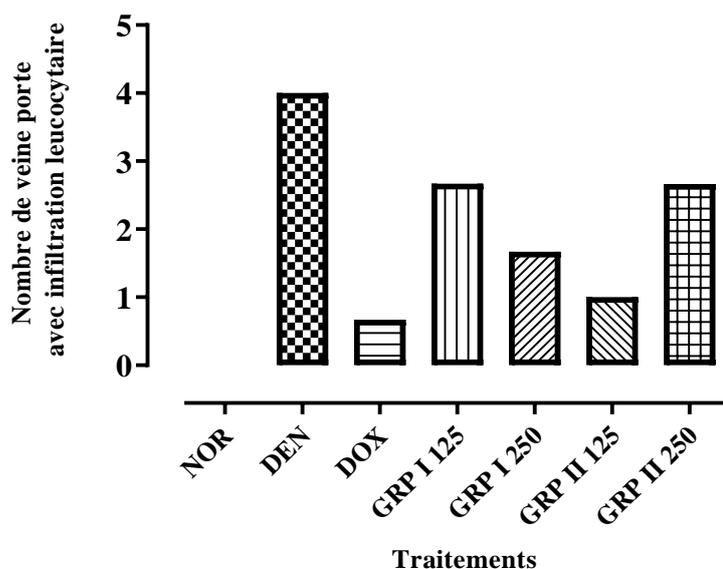


Figure 38 : Nombre de veines porte avec infiltration leucocytaire dans les groupes expérimentaux.

III.3.2.4. Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur quelques marqueurs biochimiques de l'hépatocarcinome

L'exposition des animaux au N-diéthylnitrosamine (DEN) a provoqué une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'activité des transaminases (ALAT et ASAT) de 36 et 19% respectivement comparativement au groupe normal. Par ailleurs, le traitement à la doxorubicine à la dose de 10 mg/kg et aux extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) à 125 et 250 mg/kg ont entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) des taux de transaminases en comparaison au groupe contrôle négatif (Figure 39 a, b).

Concernant le taux d'alphafoetoprotéine (AFP), il est significativement élevé chez les animaux intoxiqués uniquement au DEN comparativement au groupe normal ($p < 0,001$). La doxorubicine provoque une baisse significative du taux d'AFP de 1,9 fois en comparaison au groupe contrôle négatif ($p < 0,001$). Les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II aux doses 125 et 250 mg/kg réduisent également de manière significative le taux d'AFP de 2,2 ; 1,3 ; 2,1 et 1,5 fois respectivement en comparaison au contrôle négatif (Figure 39 c).

De plus, le N-diéthylnitrosamine cause une augmentation significative ($p < 0,001$) de la concentration sérique en créatinine en comparaison au groupe normal. Par contre, la doxorubicine, GRP I et GRP II réduisent significativement ($p < 0,001$) les taux de créatinine en comparaison au groupe contrôle négatif aux doses testées (Figure 39 d).

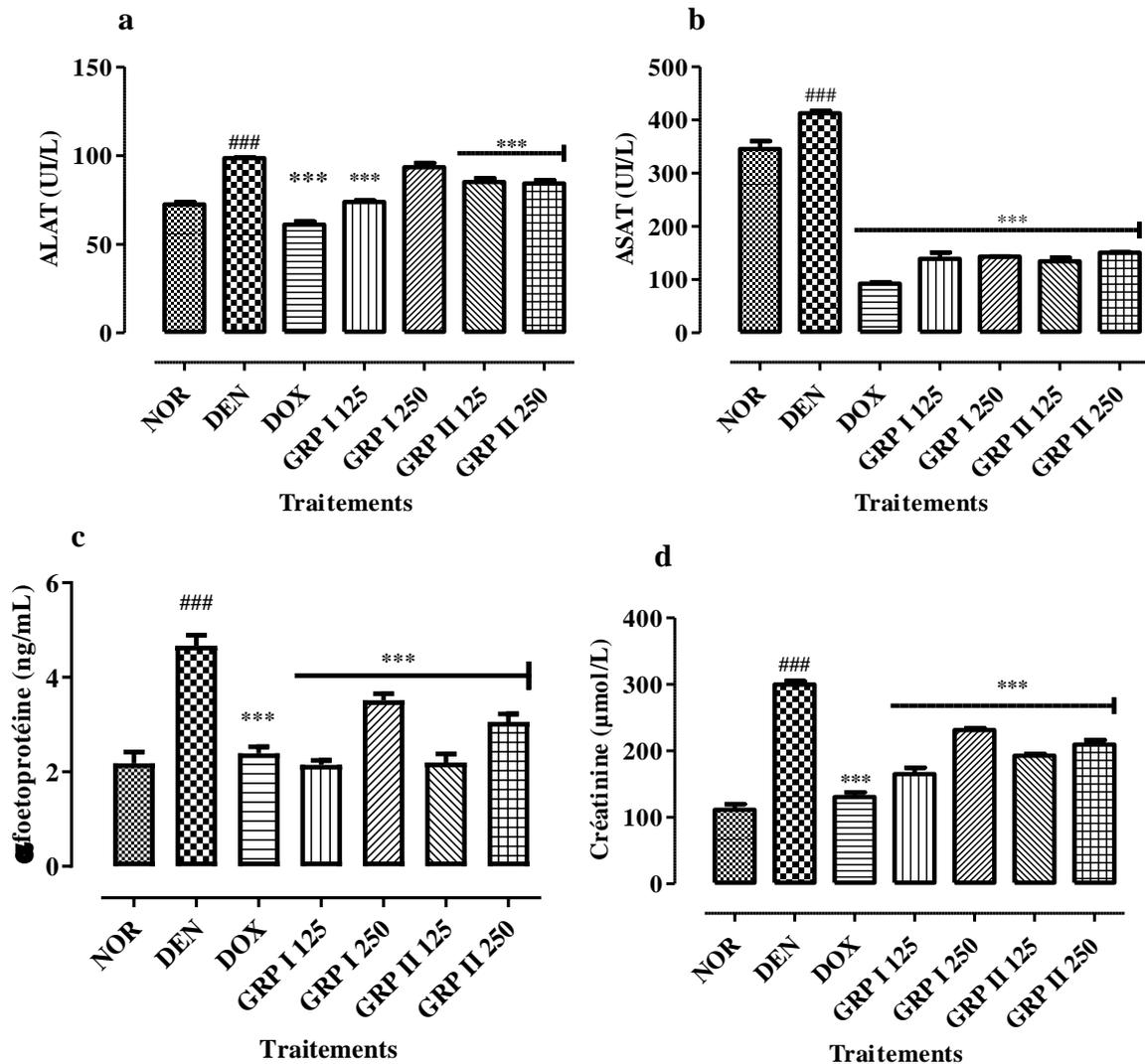


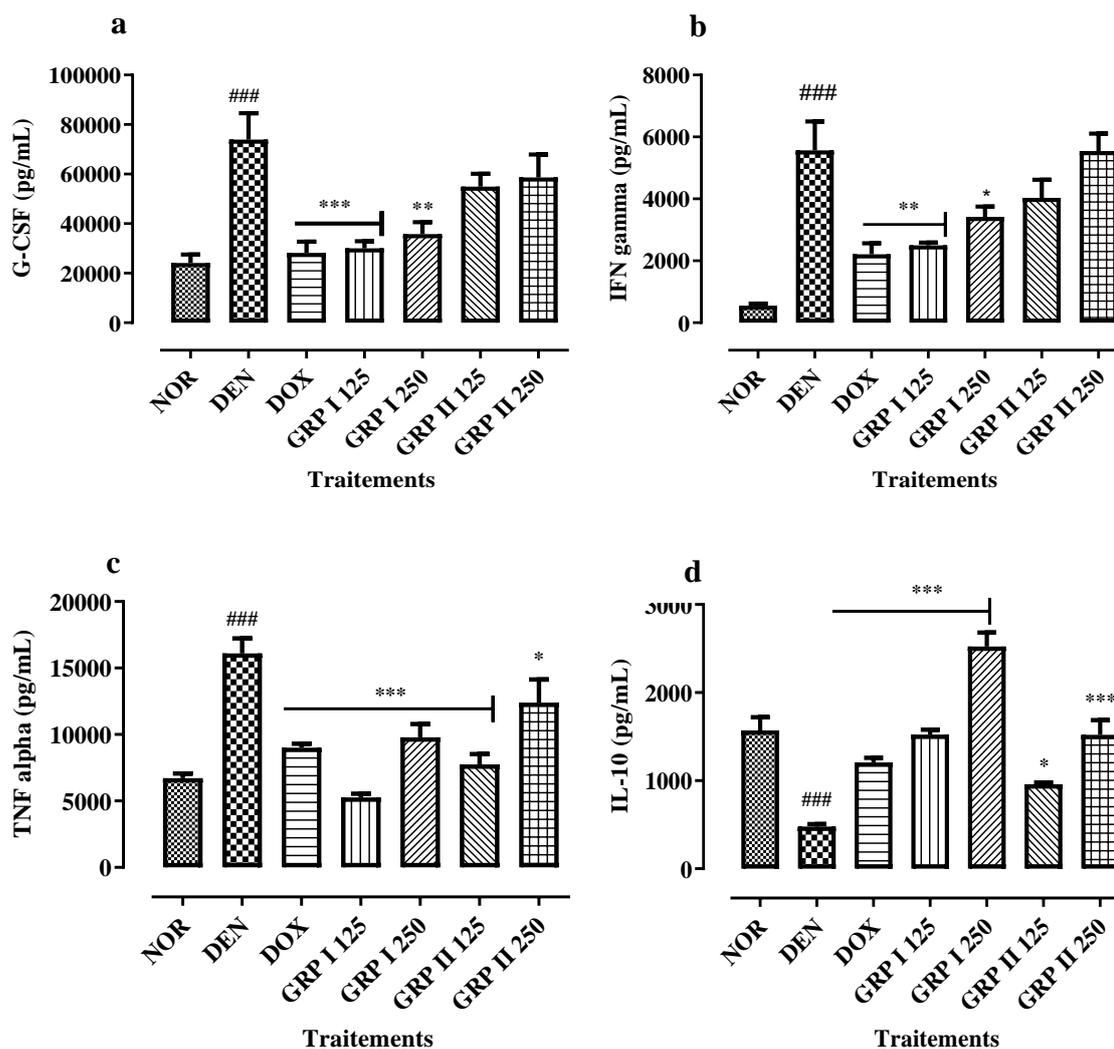
Figure 39 : Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur les taux d'ALAT (a) ; ASAT (b) ; AFP (c) et de créatinine (d)

NOR = Groupe normal (animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0,9%) ; **DEN** = contrôle négatif (animaux ayant reçu le N-diéthylnitrosamine + solution saline 0,9%) ; **DOX** = Contrôle positif (Animaux ayant reçu la doxorubicine + N-diéthylnitrosamine) ; **GRP I** = animaux ayant reçu GRP I + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg ; **GRP II** = animaux ayant reçu GRP II + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg. Les points désignent les moyennes \pm ESM (n=9). Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe Normal (NOR) ont été exposés au N-diéthylnitrosamine (100 mg/kg) pendant 10 semaines. ###p < 0,001 comparés au groupe normal, ***p < 0,001 comparés au groupe contrôle négatif.

III.3.2.4. Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur la production des cytokines et chimiokines

La figure 40 illustre les effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur la production des cytokines et des chimiokines dans le sérum. L'administration du DEN a induit une surproduction des cytokines pro-inflammatoires G-CSF, IFN- γ , TNF- α et des chimiokines : éotaxine (p < 0,01) et fractalkine (p < 0,05) en comparaison au contrôle normal.

Par contre à l'instar du contrôle positif (doxorubicine), GRP I et GRP II à 125 et 250 mg/kg ont entraîné une réduction significative des paramètres cités ci-dessus. Les effets les plus significatifs ont été observés chez les animaux traités à GRP I 125 avec des valeurs de $30000 \pm 5773,50$; $2500 \pm 182,57$; $5247,79 \pm 549,85$ pg/mL pour G-CSF ($p < 0,001$) ; IFN- γ ($p < 0,01$) et TNF- α ($p < 0,001$) respectivement (Figure 40 a-c). Le traitement à GRP I 125 a induit également de meilleurs effets inhibiteurs de la surproduction d'éotaxine et de fractalkine ($p < 0,001$), soient respectivement des teneurs de $28449,86 \pm 4523,66$ et $1686,22 \pm 62,64$ pg/mL (Figure 40 f-g). D'autre part, l'induction du DEN a induit une baisse significative des taux de cytokines anti-inflammatoires : IL-10 ($p < 0,001$) et IL-12p70 ($p < 0,05$) par rapport au groupe normal. Tandis que la doxorubicine et les extraits polysaccharidiques GRP I et GRP II aux doses testées ont induit une augmentation significative de la surproduction d'IL-10 et IL-12p70 en comparaison au groupe contrôle négatif, soient des taux les plus élevés d'IL-10 de $2524,49 \pm 312,67$ pg/mL ($p < 0,001$) pour GRP I 250 et d'IL-12p70 de $31480,93 \pm 57,84$ pg/mL ($p < 0,001$) pour GRP I 125 (Figure 40 d-e).



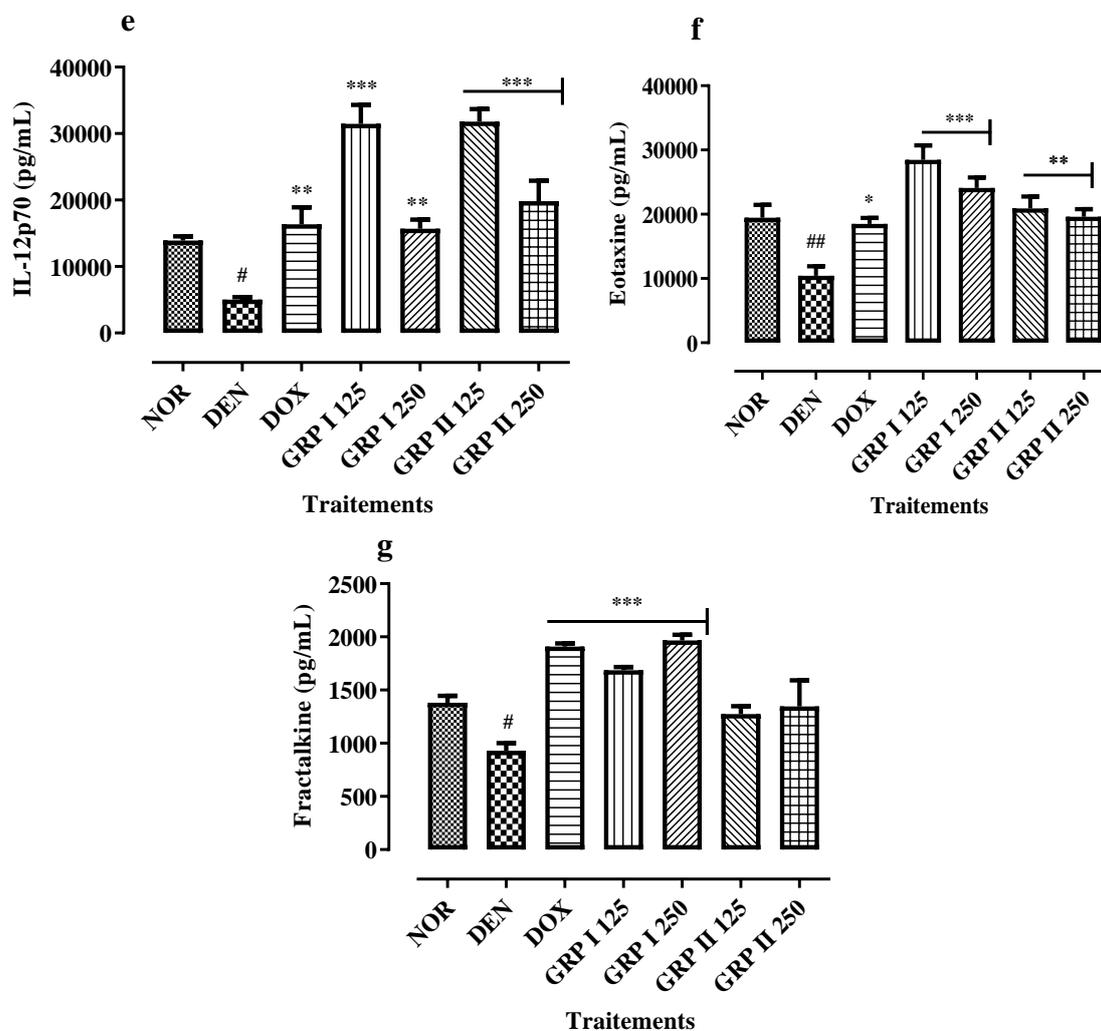


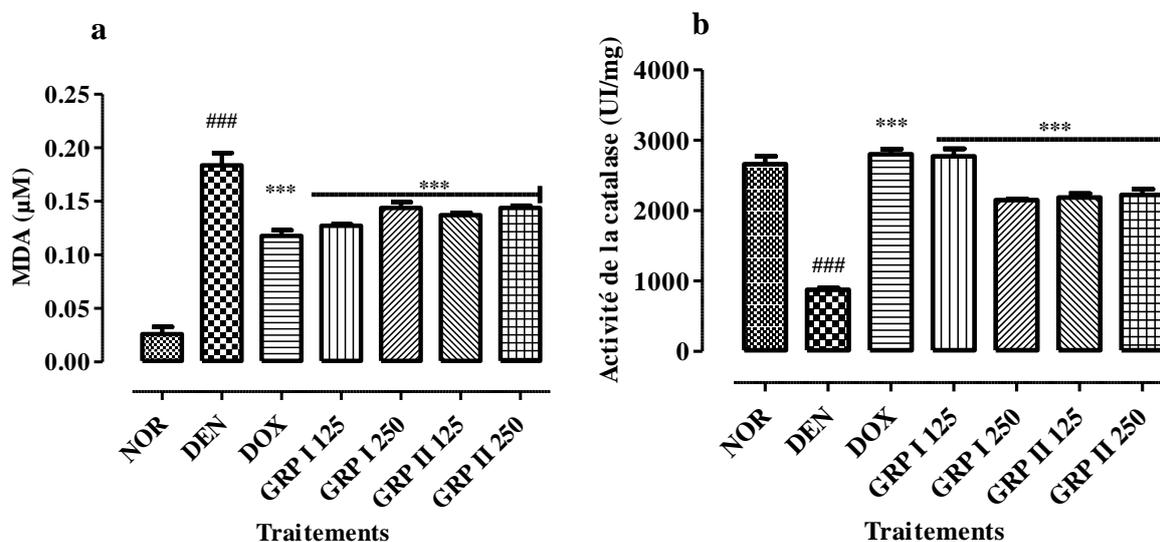
Figure 40 : Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur la production des cytokines et des chimiokines sériques.

(a) G-CSF: Growth Colony Stimulating Factor; (b) IFN- γ : Interferon- γ ; (c) TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha, (d) IL-10: Interleukine-10, (e) IL-12p70: Interleukine-12p70; (f) Eotaxine; (g) Fractalkine. Les concentrations de Cytokine/chimiokine sont représentées sous forme de moyenne \pm ESM (n =5). ### $p < 0,001$ ## $p < 0,01$ comparé au groupe normal, # $p < 0,05$ comparé au groupe normal, * $p < 0,05$ comparé au contrôle négatif, ** $p < 0,01$ comparé au contrôle négatif, *** $p < 0,001$ comparé au contrôle négatif.

III.3.2.5. Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur quelques marqueurs du stress oxydatif

Les effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur quelques marqueurs du stress oxydatif après 12 semaines de traitement sont illustrés à la figure 41. L'induction du N-diéthylnitrosamine (DEN) a provoqué une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de malondialdéhyde et d'oxyde nitrique (NO) de 6,6 et 2,0 fois respectivement par rapport au groupe normal (Figure. 41 a, e). De même, le DEN a entraîné une déplétion significative ($p < 0,001$) de l'activité des enzymes catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD) et de la

concentration en glutathion réduit (GSH) de 54,7 ; 54,5 et 47,8% respectivement par rapport au groupe normal. Cependant, la doxorubicine et les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* aux doses testées ont réduit significativement ($p < 0,001$) le taux de MDA en comparaison au contrôle négatif (Figure 41 a). L'activité de la catalase a été augmentée significativement dans les groupes traités à DOX et GRP I 125 ; de 2,5 fois pour les groupes traités à GRP I 250 ; GRP II 125 et GRP II 250 respectivement en comparaison au groupe contrôle négatif (Figure 41 b). Les traitements à la doxorubicine, GRP I 125 et GRP II 250 ont augmenté significativement ($p < 0,001$) de 1,8 ; 1,7 et 1,5 fois respectivement l'activité de la superoxyde dismutase comparativement au groupe contrôle négatif (Figure 41 c). Les extraits polysaccharidiques GRP I 125 et GRP II 125 ont entraîné une augmentation significative du taux de glutathion réduit de 1,5 et 1,3 fois ($p < 0,001$). Cette activité est significativement ($p < 0,05$) supérieure à celle de la doxorubicine qui a induit une augmentation de 1,2 fois par rapport au contrôle négatif (Figure 41 d). Concernant le NO, le DEN a provoqué une augmentation significative ($p < 0,001$) de sa concentration comparativement au groupe normal ; tandis que la doxorubicine et les extraits polysaccharidiques aux doses testées ont significativement ($p < 0,001$) réduit le taux de NO par rapport au contrôle négatif (Figure 41 e).



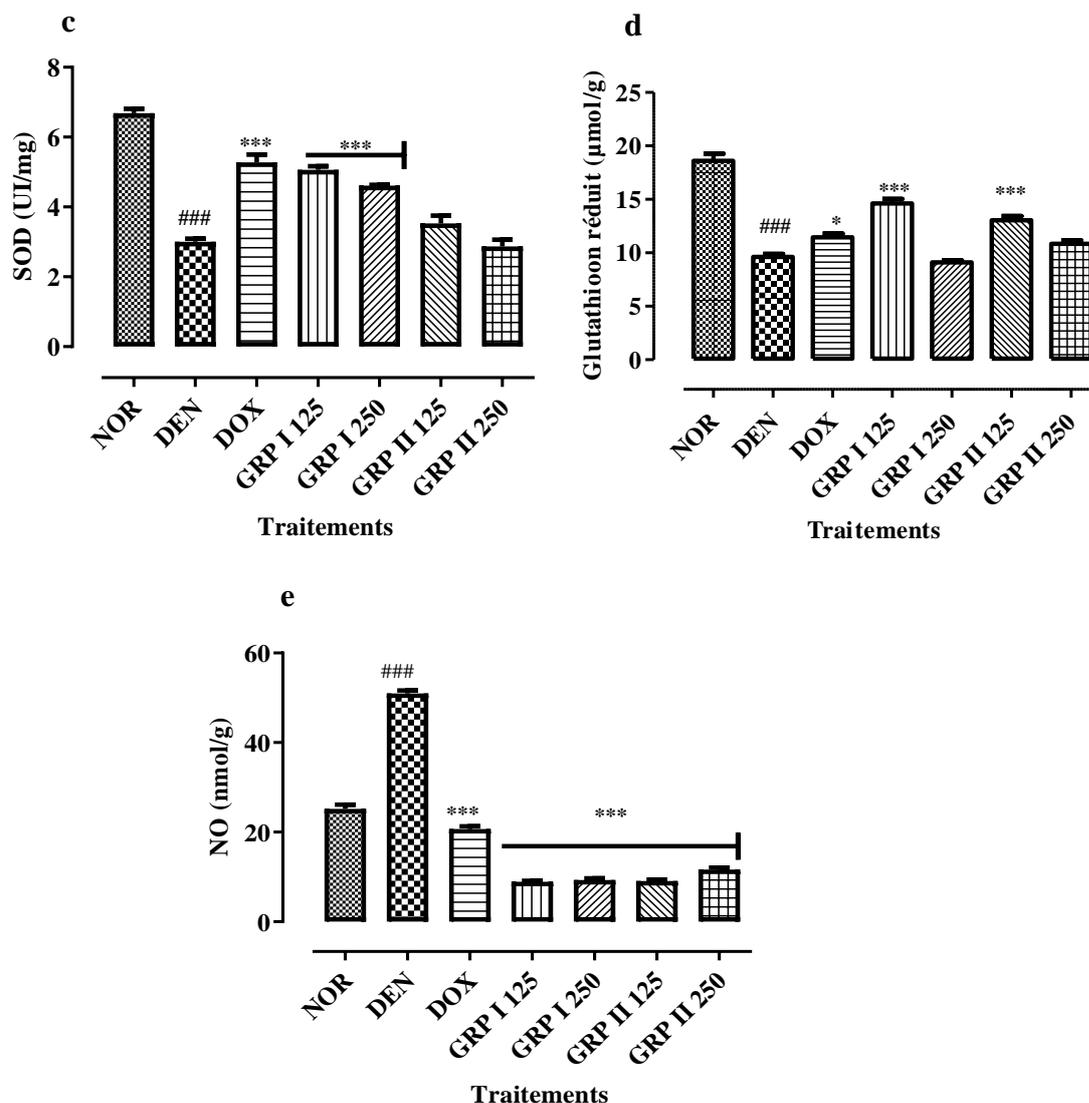


Figure 41 : Effets des extraits polysaccharidiques *G. resinaceum* sur quelques paramètres enzymatiques et non enzymatiques du stress oxydatif.

a : concentration en malondialdéhyde ; **b** : activité de la catalase ; **c** : activité de la superoxyde dismutase ; **d** : concentration en glutathion réduit ; **e** : concentration en oxyde nitrique. ### $p < 0,001$ # $p < 0,01$ comparé au groupe normal, # $p < 0,05$ comparé au groupe normal, * $p < 0,05$ comparé au contrôle négatif, ** $p < 0,01$ comparé au contrôle négatif, *** $p < 0,001$ comparé au contrôle négatif.

III.3.2.6. Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur quelques paramètres hématologiques

Les effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur les paramètres hématologiques sont consignés dans le tableau XII. Le DEN a induit une diminution significative du nombre de globules blancs, de monocytes ($p < 0,001$), de lymphocytes, de granulocytes ($p < 0,01$) et de la Concentration Corpusculaire Moyenne d'Hémoglobine (CCMH) ($p < 0,05$) en comparaison au groupe normal. Tandis que la doxorubicine a induit une augmentation significative du nombre de globules blancs, de monocytes ($p < 0,001$), de

granulocytes ($p < 0,01$) et de la CCMH ($p < 0,05$) en comparaison au groupe contrôle négatif. Chez les animaux traités avec GRP I et GRP II aux doses 125 et 250 mg/kg, il a été observé une augmentation significative du nombre de globules blancs, de lymphocytes ($p < 0,05$) et d'hématocrite ($p < 0,001$) comparativement au groupe contrôle négatif. Cependant, il y a eu une baisse significative du Volume Corpusculaire Moyen (VCM) ($p < 0,001$) et du nombre de granulocytes dans les groupes GRP I 125 ($p < 0,05$) et GRP I 250 ($p < 0,001$) respectivement. Le nombre de monocytes a significativement baissé chez les animaux traités à GRP II 125 ($p < 0,01$) et GRP II 250 ($p < 0,05$) en comparaison au groupe contrôle négatif.

Tableau XII : Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur les paramètres hématologiques après 12 semaines de traitement.

Paramètres	NOR	DEN	DOX	GRP I + DEN (mg/kg)		GRP II + DEN (mg/kg)	
				125	250	125	250
GB ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	11,30 \pm 0,55	5,45 \pm 0,21#	16,23 \pm 0,09***	11,6 \pm 0,51*	12,8 \pm 0,10*	14,60 \pm 0,16**	15,8 \pm 0,85**
Lymphocytes (%)	77,06 \pm 3,43	62,6 \pm 3,82##	70,45 \pm 3,71**	59,7 \pm 2,49	73,3 \pm 0,96*	65,53 \pm 3,60	58,45 \pm 2,05
Monocytes (%)	10,12 \pm 1,89	19,05 \pm 1,62###	11,33 \pm 0,6***	11,2 \pm 0,74***	11,4 \pm 0,49***	11,7 \pm 0,65***	11,65 \pm 1,91*
Granulocytes (%)	14,17 \pm 0,481	21,75 \pm 1,48###	18,25 \pm 1,43**	23,77 \pm 3,18*	15,4 \pm 0,53***	22,10 \pm 0,86**	29,90 \pm 0,14***
GR ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	5,98 \pm 0,35	4,95 \pm 0,15	4,66 \pm 0,42	6,29 \pm 0,28	6,76 \pm 0,18	5,33 \pm 0,27	5,61 \pm 0,68
Hématocrite (%)	40,22 \pm 0,55	33,20 \pm 1,70	34,07 \pm 1,93	41,55 \pm 0,52*	47,80 \pm 1,50***	38,47 \pm 0,58	39,20 \pm 1,55
VCM (fL)	67,24 \pm 1,36	72,00 \pm 1,84#	71,87 \pm 0,48	67,70 \pm 1,17	70,70 \pm 1,78	73,40 \pm 0,86	69,65 \pm 1,91
VPM (fL)	7,04 \pm 0,66	8,60 \pm 1,41#	9,43 \pm 0,57	6,17 \pm 0,74***	6,40 \pm 0,36***	8,63 \pm 0,05	8,70 \pm 0,71
Plaquettes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	584,20 \pm 56,15	590 \pm 22,63	631,50 \pm 65,73	659,00 \pm 41,72	614,00 \pm 77,48	426,00 \pm 36,74	543,00 \pm 42,43
Hémoglobine (g/dL)	11,84 \pm 1,11	10,95 \pm 0,07	10,00 \pm 0,08	11,97 \pm 0,17	14,30 \pm 0,27	10,97 \pm 0,05	10,60 \pm 0,42
CCMH (g/dL)	29,40 \pm 1,78	28,25 \pm 0,21	24,97 \pm 0,61*	28,85 \pm 1,50	30,00 \pm 2,33	26,73 \pm 1,17	27,05 \pm 0,64

NOR = Groupe normal (Animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0.9%) ; *DEN* = contrôle négatif (animaux ayant reçu le N-diéthylnitrosamine + solution saline 0.9%); *DOX + DEN* = Contrôle positif (Animaux ayant reçu la doxorubicine + N-diéthylnitrosamine) ; *GRP I + DEN* = animaux ayant reçu GRP I + N-diéthylnitrosamine doses 125 et 250 mg/kg ; *GRP II + DEN* = Animaux ayant reçu GRP II + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg. Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe Normal (*NOR*) ont été exposés au N-diéthylnitrosamine (100 mg/kg) pendant 10 semaines. ###*p* < 0,001, ##*p* < 0,01 comparés au groupe normal, #*p* < 0,05 comparés au groupe normal, **p* < 0,05 comparés au groupe contrôle négatif, ***p* < 0,01 comparés au groupe contrôle négatif., ****p* < 0,001 comparés au groupe contrôle négatif. **GB** : Globules blancs ; **GR** : Globules rouges ; **VCM** : Volume corpusculaire moyen ; **VPM** : Volume plaquettaire moyen ; **CCMH** : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.

III.3.2.7. Effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur la masse relative des organes après 12 semaines de traitement

Le tableau XIII présente les effets des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur la masse relative des organes au cours de l'expérimentation. Tous les traitements affectent de manière significative la masse relative des animaux tout au long de l'expérience. Chez les animaux traités au N-diéthylnitrosamine, il y a eu une augmentation significative de la masse relative de tous les organes prélevés, à l'exception des glandes surrénales et du cœur par rapport au groupe normal ($p < 0,01$). Par ailleurs, les traitements à la doxorubicine, GRP I et GRP II ont induit une baisse significative de la masse relative des organes après 12 semaines de traitement. Toutefois, GRP I 125 a présenté les meilleurs effets sur la masse relative du foie, des reins et de la rate ($p < 0,001$) par rapport au groupe DEN.

Tableau XIII : Effets des extraits polysaccharidiques sur la masse relative des organes frais (g/100 g PC) des groupes expérimentaux après 12 semaines de traitement.

Organes (mg/kg)	NOR	DEN	DOX + DEN	GRP I + DEN (mg/kg)		GRP II + DEN (mg/kg)	
				125	250	125	250
Foie	327,4 ± 40,3	433,9 ± 17,5 ###	325,5 ± 35,3***	335,6 ± 32,2***	414,7 ± 42,3	394,9 ± 14,9	446,0 ± 16,7
Reins	59,7 ± 3,2	86,8 ± 5,8###	73,3 ± 3,1***	75,4 ± 3,4***	75,8 ± 3,4 **	73,7 ± 4,8 **	82,5 ± 4,7
Glandes surrénales	2,4 ± 0,5	2,5 ± 0,2	3,7 ± 0,6	3,2 ± 0,4	3,6 ± 0,8	3,4 ± 1,2	4,82 ± 0,2***
Coeur	37,2 ± 3,9	38,7 ± 3,7	40,7 ± 4,7	39,1 ± 4,3	40,1 ± 1,4	37,0 ± 4,5	41,6 ± 2,5
Poumons	68,6 ± 0,6	142,8 ± 4,5###	136,3 ± 1,7**	91,3 ± 4,7***	103,4 ± 0,3 ***	97,7 ± 2,7***	123,7 ± 3,2***
Rate	36,6 ± 2,3	55,2 ± 1,5###	41,6 ± 2,3***	48,8 ± 1,1*	62,5 ± 4,8**	74,4 ± 4,0***	70,4 ± 4,1***
Cerveau	96,0 ± 2,7	126,5 ± 3,8###	125,4 ± 3,0	104,8 ± 7,0***	98,7 ± 5,0***	109,5 ± 0,8***	138,0 ± 6,9**
Testicules	131,3 ± 8,7	94,1 ± 0,6###	123,0 ± 5,4***	132,0 ± 1,6***	158,4 ± 1,4 ***	101,4 ± 2,6 *	81,8 ± 2,7***
Vésicules séminales	55,8 ± 4,6	31,0 ± 1,3###	7,4 ± 0,7***	10,3 ± 1,0***	38,8 ± 0,7***	17,2 ± 1,2***	5,1 ± 0,3***
Epididyme	49,5 ± 3,3	32,0 ± 2,3###	32,5 ± 3,1	36,7 ± 4,3	21,6 ± 0,4***	30,2 ± 1,9	20,1 ± 3,1***
Fémur	37,6 ± 2,1	29,9 ± 1,5###	39,2 ± 3,5***	43,2 ± 0,6***	30,2 ± 0,7	31,0 ± 1,6	52,2 ± 2,7***

NOR = Groupe normal (Animaux ayant reçu uniquement la solution saline 0.9%) ; *DEN* = contrôle négatif (animaux ayant reçu le N-diéthylnitrosamine + solution saline 0.9%); *GRP I + DEN* = animaux ayant reçu GRP I + N-diéthylnitrosamine doses 125 et 250 mg/kg ; *GRP II + DEN* = Animaux ayant reçu GRP II + N-diéthylnitrosamine aux doses 125 et 250 mg/kg. Tous les animaux à l'exception de ceux du groupe Normal (*NOR*) ont été exposés au N-diéthylnitrosamine (100 mg/kg) pendant 10 semaines. ###*p* < 0,001, ##*p* < 0,01 comparés au groupe normal, #*p* < 0,05 comparés au groupe normal, **p* < 0,05 comparés au groupe contrôle négatif, ***p* < 0,01 comparés au groupe contrôle négatif, ****p* < 0,001 comparés au groupe contrôle négatif. **GB** : Globules blancs ; **GR** : Globules rouges ; **VCM** : Volume corpusculaire moyen ; **VPM** : Volume plaquettaire moyen ; **CCMH** : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.

III.3.3. Discussion partielle 3

Le cancer constitue l'une des principales causes de mortalité et est un problème de santé publique. La prévalence des cancers ne cesse d'augmenter ; en 2020 environ 19,3 millions de nouveaux cas de cancers et 10 millions de décès ont été enregistrés (Hyuna *et al.*, 2021). Selon, l'OMS, ces chiffres pourraient s'accroître de 50% et près de 70% de nouveaux cas surviendraient dans les pays en développement d'ici 2030. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) ou hépatocarcinome cellulaire (HCC) constitue la troisième cause de morbidité par cancer, entraînant près d'un million de décès chaque année (Zhao *et al.*, 2016). Le taux de survie après le diagnostic de cette maladie est très faible (~5%), car le CHC est souvent diagnostiqué à un stade avancé (Llovet *et al.*, 2003). De plus, les médicaments utilisés dans le traitement du CHC sont associés à l'hépatotoxicité, et des effets secondaires ont été observés avec des médicaments tels que le 5-fluorouracile, la cisplatine et la doxorubicine (Zhou *et al.*, 2016). Ainsi, il est urgent de développer des thérapies moins toxiques et plus efficaces ciblant le stress oxydatif et la prolifération des cellules tumorales à base des composés bioactifs d'origine naturelle (Bishayee, 2012 ; Singh *et al.*, 2014). Les polysaccharides dérivés de champignons sont de plus en plus exploités à cet effet dans la chimioprévention des cancers à cause de leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, immunomodulatoires et antitumorales (Chakraborty *et al.*, 2021). Dans le but d'apporter notre contribution à cette thématique nous avons entrepris cette étude afin de valoriser les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* comme potentiels agents antitumoraux.

La cytotoxicité est un outil utile pour indiquer les effets inhibiteurs de la croissance ou létaux d'une substance (Weyermann *et al.*, 2005). L'une des méthodes les plus couramment utilisées à cet effet est le test colorimétrique au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) (Mosmann, 1983). Ce test permet de déterminer la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT de couleur jaune en formazan par le NADH sous l'action des enzymes mitochondriales telles que la succinate déshydrogénase. (Aslantürk *et al.*, 2017). Dans notre étude, les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont présenté des effets cytotoxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses MDA-MB 231, Hela et HepG₂ avec des CC₅₀ variant de 298 à 420 µg/mL après 48 h d'incubation. Les polysaccharides sont généralement connus pour exercer les activités anticancéreuses *in vitro* soit en régulant le cycle cellulaire, la concentration intracellulaire de Ca²⁺, en déclenchant l'apoptose, en inhibant l'accumulation et le fonctionnement des lymphocytes Tregs par induction du microARN-125b (Li *et al.*, 2015 ; Fan *et al.*, 2017 ; Hu *et al.*, 2017 ; Belhaj *et al.*, 2018). Ces propriétés pourraient être associées

à la conformation spécifique des polysaccharides et à leur affinité pour la surface des cellules cancéreuses (Zhang *et al.*, 2015). Les activités antioxydante, anti-inflammatoire, cytotoxique et les utilisations traditionnelles de *G. resinaceum* pour traiter des affections hépatiques, nous ont motivé à déterminer les activités antitumorales *in vivo* des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

En raison de ses nombreuses fonctions, notamment le métabolisme des glucides, des graisses et des protéines, la biosynthèse de l'urée et du cholestérol, le stockage des vitamines et des minéraux, la régulation de la glycémie et l'élimination des xénobiotiques du sang (comme l'alcool et les drogues), le foie est la cible privilégiée des substances chimiques toxiques (Santos *et al.*, 2017). Les nitrosamines tels que le N-diéthylnitrosamine (DEN) sont des composés chimiques présents dans le tabac, l'eau polluée, les produits cosmétiques, les produits carnés et certains produits pharmaceutiques (Sun *et al.*, 2012). Le DEN est largement utilisé pour induire les tumeurs hépatiques chez les rongeurs, les lapins, les cochons d'Inde, les cobayes, les chiens et ces tumeurs sont quasi identiques à celles retrouvées chez les humains (Lee *et al.*, 2004). L'hépatocarcinome induit au DEN est donc un modèle expérimental aisément reproductible et très répandu (Mitchell *et al.*, 2016 ; Chen *et al.*, 2019). Dans cette étude, une dose de 100 mg/kg de DEN a été administrée par voie intrapéritonéale une fois par semaine pendant 10 semaines ; suivie de l'administration du phénobarbital (PB) 0,1% à travers l'eau de boisson. En effet, la biotransformation du DEN après activation par les enzymes du cytochrome P450 dont le CYP2E1 donnent des métabolites pro-mutagènes : O⁶-éthyl-désoxyguanosine ; O⁴ et O⁶-éthyl-désoxythymidine qui forment des adduits avec l'ADN et les protéines cellulaires entraînant une instabilité génomique et éventuellement une transformation des cellules normales en cellules pré-néoplasiques et néoplasiques (Fausto *et al.*, 2010 ; Tolba *et al.*, 2015). La désalkylation du DEN en métabolites mutagènes actifs peut être modulée de manière significative chez les rats et les souris par des substances secondaires telles que le 3-méthylcholanthrène et le phénobarbital. Ce dernier est généralement utilisé comme promoteur du CHC à cause de son hépatotoxicité. En effet, le PB a une forte activité sur les hépatocytes centro-lobulaires en induisant l'activation métabolique et l'augmentation des enzymes hépatiques, y compris le cytochrome P450, les glucuronosyl transférases et les glutathion S-transférases. Il est clairement établi que la combinaison DEN/PB cause le développement du CHC à travers plusieurs étapes avec la formation des foci pré-néoplasiques, des nodules néoplasiques et des nodules d'hépatocarcinome (Ting *et al.*, 2014). La doxorubicine (contrôle positif) est un antibiotique de la famille des anthracyclines largement utilisé dans le traitement des cancers hépatiques chez l'homme. Son mécanisme

d'action antitumoral consiste en la rupture des doubles brins d'ADN médiée par la topoisomérase ciblant par conséquent des dommages ultérieurs d'ADN associés à l'arrêt du cycle cellulaire et aux voies d'apoptose. De plus, elle inhibe l'activité mitochondriale, la production des ERO pouvant déclencher l'apoptose (Cox & Weinman, 2016).

La variation de poids corporel est un paramètre critique exploité en physiopathologie (So *et al.*, 2009). Dans la présente étude, l'administration de DEN a conduit à une perte de poids des animaux en comparaison au groupe normal. Cependant, tout comme la doxorubicine les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont induit une perte de poids chez les animaux au cours de l'expérimentation. Ces résultats ne sont pas en adéquation avec ceux de Wu *et al.*, 2018 qui ont montré que les polysaccharides de *Porios cocos* restaurent la perte de poids chez les rats suite à l'administration d'acétaminophène aux rats. Ceci pourrait être dû probablement à un effet anorexigène suite à une exposition prolongée (Wu *et al.*, 2018).

La détermination du pourcentage de survie a permis d'observer un fort taux de mortalité chez les animaux du groupe DEN et par conséquent un faible taux de survie (30%). Par contre, les animaux des groupes GRP I 125, GRP I 250, GRP II 125 et GRP II 250 ont présenté des taux de survie de 55%, 40%, 65% et de 45% respectivement. Ce faible taux de survie observé chez les animaux ayant reçu le DEN serait dû aux propriétés génotoxiques, carcinogènes et tératogènes des N-nitrosodialkylamines tels que le N-diéthylnitrosamine (Fausto *et al.*, 2010). Ces résultats sont en adéquation avec les résultats obtenus sur la cytotoxicité qui ont révélé que les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* inhibent la croissance de trois lignées de cellules cancéreuses MDA MB 231, Hela et HepG₂ avec des CC₅₀ variant de 261,7 à 420,3 µg/mL. En effet, GRP II 125 présente simultanément le meilleur pouvoir cytotoxique et le meilleur pouvoir protecteur.

L'exposition aiguë à une forte dose de N-diéthylnitrosamine couplé au phénobarbital entraîne un développement rapide d'un hépatocarcinome. Plusieurs auteurs à l'instar de Rajasekaran *et al.*, 2011 ; Hooshmand *et al.*, 2021 ont signalé que l'administration intrapéritonéale d'une dose unique de 200 mg/kg suivie d'une administration intragastrique de phénobarbital (0,05%) à travers l'eau de boisson, provoque l'apparition d'un hépatocarcinome au bout de 16 semaines. Dans la présente étude après 12 semaines d'expérimentation, aucune tumeur hépatique palpable n'a été observée chez les animaux. Cependant, l'analyse microscopique des coupes histologiques des sections de foie des groupes traités au DEN a montré une infiltration massive de cellules inflammatoires reflétant l'initiation d'un carcinome hépatocellulaire. Ces observations prouvent l'évidence de la cancérogénicité du N-diéthylnitrosamine couplé au phénobarbital (DEN/PB) (Shaarawy *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*,

2012). Les spécimens de foie de rats traités aux extraits polysaccharidiques après administration de DEN ont montré une microarchitecture quasi-normale présentant quelques foyers d'infiltration de cellules inflammatoires dispersés dans le lobule hépatocytaire et des veines porte non dilatées. Des observations similaires ont été rapportées sur l'effet protecteur des polysaccharides et d'autres substances naturelles provenant de plantes et de champignons tels que *Lycium chinensis*, *Astragalus membranaceus*, *Antrodia cinnamomea*, *Lycium barbarum*, *Mangifera indica* sur les lésions hépatiques d'origine chimique (Cui *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2014 ; Xiao *et al.*, 2014 ; Fahmy *et al.*, 2016). Les résultats histopathologiques obtenus dans cette étude sont confirmés par les analyses biochimiques. En effet, le foie est un organe primaire de détoxification qui désactive et évacue les substances toxiques à travers les urines. Les biomarqueurs hépatiques tels que les transaminases (ALAT, ASAT) et le taux d'alphafœtoprotéine (AFP) renseignent sur l'état physiologique du foie (Nyblom *et al.*, 2004). L'induction du DEN a provoqué des lésions hépatiques corrélée à une augmentation des taux d'ALAT et d'ASAT dans le sérum en comparaison au groupe normal. Le DEN modifie l'architecture de la membrane cellulaire entraînant le déversement de ces enzymes dans le sérum et une accumulation dans la circulation sanguine (Ganeshkumar *et al.*, 2016 ; Fathy *et al.*, 2017). L'AFP est une glycoprotéine synthétisée dès le début de la vie fœtale ; et dont le taux chute rapidement après la naissance. Toutefois, l'élévation du taux sérique d'alphafœtoprotéine est généralement caractéristique d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) avancé chez l'adulte (Sauzay *et al.*, 2016). En effet, l'AFP joue un rôle essentiel dans le transport de nombreux ligands tels que les métaux lourds, la bilirubine et de nombreux xénobiotiques. De plus, l'AFP intervient dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'immunosuppression (Sauzay *et al.*, 2016 ; Park *et al.*, 2017). GRP I et GRP II ont diminué les taux sériques d'ALAT, d'ASAT et d'AFP ce qui permet de maintenir l'intégrité de la membrane plasmique et d'éviter la libération des enzymes à travers les membranes. Ces résultats reflètent l'habileté de GRP I et GRP II à inhiber l'initiation et la promotion de l'hépatocarcinome cellulaire.

Les cytokines sont des molécules de nature polypeptidique et de faible poids moléculaire qui assurent la communication cellulaire. Elles sont produites par divers types de cellules immunitaires dans le foie et jouent un rôle fondamental dans l'initiation, la promotion et la progression des tumeurs. En effet, la tumorigenèse est favorisée par la surproduction des cytokines pro-inflammatoires tels que G-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12p70 par les cellules néoplasiques et les macrophages (Dranoff *et al.*, 2004). En outre, les chimiokines telles que l'éotaxine et la fractalkine qui appartiennent à une superfamille de molécules pro-

inflammatoires fournissent des signaux pour le recrutement des leucocytes aux sites de l'inflammation (Ferretti *et al.*, 2014). L'administration de DEN a induit une surproduction des cytokines pro-inflammatoires (G-CSF, IFN- γ , TNF- α) et des chimiokines (éotaxine et fractalkine) tandis que, GRP I à 125 mg/kg a inhibé significativement cette surproduction. Par contre, les taux d'IL-10 et d'IL-12p70 ont significativement augmenté dans les groupes traités à GRP I en comparaison au contrôle négatif. Les polysaccharides issus des plantes médicinales sont de potentiels agents antitumoraux grâce à leurs activités immunorégulatrices (Wang *et al.*, 2012 ; Yang *et al.*, 2013). Les chimiokines tels que la fractalkine jouent un rôle primordial dans le développement de l'hépatocarcinome cellulaire. En effet, l'expression de la fractalkine et de son récepteur CX3CR1 est accrue dans les hépatocytes en cas de lésion du foie. Les activités antitumorales de la fractalkine ont été mises en exergue dans plusieurs études *in vivo* sur les souris (Matsubara *et al.*, 2007).

Les éotaxines sont des cytokines à potentiel chémoattractant généralement impliquées dans les maladies allergiques. Elles jouent aussi un rôle dans la régulation des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral ou ont directement un effet cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses (Zajkowska *et al.*, 2021). Des études ont révélé que la présence des "Tumor- associated tissue eosinophilia (TATE) " ou la dégranulation des éosinophiles est associée à un pronostic élevé de certains types de cancers notamment le cancer colorectal, de l'œsophage, de la vessie et de la prostate (Zajkowska *et al.*, 2021).

L'implication du stress oxydatif dans la tumorigenèse est clairement établie à travers l'influence des ERO sur la peroxydation lipidique membranaire, les lésions tissulaires, les dommages sur l'ADN et la mutagenèse (Ziech *et al.*, 2010). Les dommages occasionnés par l'induction du DEN sont dus à la surproduction des radicaux libres qui réagissent avec les protéines, les lipides et les acides nucléiques. La biotransformation du DEN sous l'action des cytochromes P450 produit des adduits promutagènes O⁴ et O⁶-éthyl désoxythymidine qui se fixent à l'ADN et déstabilisent les séquences de gène. Par conséquent ces composés électrophiles outrepassent les défenses antioxydantes, créant ainsi le stress oxydatif et initient l'hépatocarcinogénèse (Kang *et al.*, 2007 ; Omura *et al.*, 2014). Dans cette étude, le DEN a provoqué une diminution significative de l'activité de la SOD, de la catalase, du taux de glutathion réduit (GSH) et une augmentation significative du taux de MDA, produit final de la peroxydation lipidique tels que rapportés précédemment par Hebatallah *et al.* (2013). De plus, une surexpression de l'oxyde nitrique inductible (iNOS) et un taux élevé d'oxyde nitrique (NO) ont été relevés dans les cas de CHC induit au DEN. L'oxyde nitrique intervient principalement dans la vasodilatation, la communication intercellulaire et la cytotoxicité

favorisant ainsi la nécrose des cellules hépatiques. L'hépatotoxicité due à la surproduction de NO sous l'action de iNOS est très souvent associée à l'activation des cellules inflammatoires (Song *et al.*, 2008). Cependant, ces effets pro-oxydants du DEN, ont été atténués considérablement par GRP I à la dose de 125 mg/kg, confirmant ainsi que les propriétés antitumorales des polysaccharides passeraient par un mécanisme antioxydant. La réduction du taux sérique de NO par GRP I et GRP II suggère que leurs effets hépatoprotecteurs seraient aussi liés à leur capacité à inhiber la surproduction de NO. Les polysaccharides des plantes médicinales sont en effet capables d'inhiber le stress oxydatif induit par le DEN chez les rats (Hussein *et al.*, 2015).

Les marqueurs hématologiques jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire systémique et ont été corrélés à plusieurs pathologies comme les cancers. Il est donc judicieux d'étudier les variations des paramètres hématologiques chez les patients atteints d'hépatocarcinome cellulaire à des intervalles de temps réguliers durant le traitement (Shrivastava *et al.*, 2016 ; Mokh *et al.*, 2019). Le DEN a induit une pancytopénie qui se manifeste par une chute drastique du taux de globules blancs, de lymphocytes, monocytes granulocytes et de volume corpusculaire moyen (VCM) en comparaison au groupe normal. Les faibles concentrations de globules rouges, d'hémoglobine, symptômes d'une anémie normocytaire et normochromique sont fréquents chez les patients souffrant de CHC au stade primaire (Selvamani et Thomas, 2017). De plus, la leucopénie et la thrombocytopénie observées dans cette étude sont présentes en cas de splénomégalie. Les paramètres hématologiques anormaux dans les maladies hépatiques chroniques sont liées aux dommages de la moelle épinière et des membranes plasmiques qui contiennent des taux élevés de produits pro-oxydants. De plus, ces effets sont généralement corrélés à la baisse de la masse relative des organes lymphoïdes secondaires (Carr, 2016 ; Solomon *et al.*, 2017). Par ailleurs, GRP I et GRP II à 125 mg/kg ont significativement augmenté le taux de globules blancs, de lymphocytes et d'hématocrite. Ces résultats suggèrent que les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* atténuent les effets néfastes de l'anémie et la leucocytose dues à l'intoxication au DEN.

III.3.4. Conclusion partielle 3

En conclusion, les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* ont présenté des effets chimiopréventifs. GRP I et GRP II ont présenté des effets cytotoxiques vis-à-vis des lignées de cellules cancéreuses MDA-MB 231, Hela et HepG₂ après 48 h d'incubation. Elles possèdent également la capacité à initier la réponse immunitaire en régulant la production des cytokines et des chimiokines inflammatoires. Les données biochimiques, histologiques et

hématologiques obtenues montrent que les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* exerceraient leurs effets chimiopréventifs par des mécanismes impliquant l'inhibition du stress oxydatif et la régulation du processus inflammatoire. Toutefois, les meilleures activités ont été relevées chez les rats traités avec GRP II à 125 mg/kg.



Conclusion et Perspectives



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

La recherche des composés bioactifs à potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et antitumoral et à très faible innocuité intéresse de plus en plus la communauté scientifique à cause de la recrudescence des pathologies telles que les cancers. Cette étude dont l'objectif était d'évaluer les activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antitumorales de *G. resinaceum* a été entreprise dans cette optique. Pour atteindre cet objectif, l'étude a été menée de façon séquentielle :

❖ La première partie a consisté à déterminer la composition chimique et les activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* des extraits de *G. resinaceum*. Il en ressort que : les extraits polysaccharidiques des carpophores de *G. resinaceum* renferment une diversité de métabolites primaires et secondaires dont les plus abondants sont les sucres totaux. Ces extraits possèdent un pouvoir antioxydant caractérisé par des activités anti-radicalaires DPPH, ABTS ; chélatrices des ions métaux, réductrices des ions ferriques et de piégeage de NO aux concentrations testées (25-200 µg/mL). GRP I à la dose 125 mg/kg présentent de meilleures activités antioxydantes *in vivo* en inhibant la peroxydation lipidique, en augmentant l'activité enzymatique de la catalase et de la SOD en comparaison aux animaux du groupe contrôle négatif.

❖ Dans la deuxième partie qui a consisté à évaluer les activités anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* sur un modèle expérimental induit à la *k*-carraghénine chez les rats Wistar, nous retenons que : De tous les extraits de *G. resinaceum*, GRP I et GRP II possèdent les meilleures activités anti-inflammatoires. Aux concentrations de 100 à 500 µg/mL, GRP I et GRP II possèdent des effets protecteurs de la membrane des érythrocytes murins et inhibiteurs de la dénaturation des protéines. À la dose de 125 mg/kg, GRP I et GRP II inhibent le développement de l'œdème induit par injection de la *k*-carraghénine dans la patte postérieure gauche de l'animal. Sur le plan histologique, GRP I et GRP II restaurent une microarchitecture quasi normale et limitent l'infiltration des cellules immunitaires dans les tissus sous cutanés. Sur le plan biochimique, ces extraits inhibent significativement la surproduction des cytokines pro inflammatoires (G-CSF, TNF- α), des chimiokines (éotaxine, fractalkine) et augmentent significativement les taux de cytokines anti-inflammatoires (IL 10, IL 12p70).

❖ Dans la troisième partie qui a consisté à évaluer la cytotoxicité et les effets chimiopréventifs des extraits polysaccharidiques (GRP I et GRP II) sur un modèle d'hépatocarcinome induit chez le rat Wistar, il en découle que : les extraits

polysaccharidiques de *G. resinaceum* (GRP I et GRP II) ont présenté des effets cytotoxiques vis-à-vis des lignées de cellules cancéreuses MDA-MB 231, Hela et HepG₂ après 48h d'incubation. Toutefois, GRP II à la dose de 125 mg/kg a montré un meilleur potentiel chimiopréventif notamment en protégeant les tissus hépatiques des rats contre les dégâts causés par une intoxication au DEN ; en régulant la production des cytokines et des chimiokines inflammatoires. De plus, GRP II inhibe le stress oxydatif induit par le DEN en stimulant l'activité de la SOD, de la catalase, en augmentant le taux de GSH, en inhibant la surproduction de NO et la peroxydation lipidique.

Perspectives

Les études ultérieures afin de poursuivre les travaux initiés dans cette étude viseront à :

- Purifier et élucider la structure des polysaccharides contenus dans les extraits polysaccharidiques d'intérêt ;
- Evaluer les activités antitumorales des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum* sur d'autres modèles de cancers ;
- Produire les carpophores de *G. resinaceum* par culture *in vitro* en mimant la nature afin d'augmenter leurs rendements en polysaccharides et les caractériser.



**Références
bibliographiques**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adib-Conquy, M and Cavaillon, J.M. (2012). Réponse inflammatoire et anti-inflammatoire de l'hôte au cours du sepsis. *Pathologie Biologie*. 60:306-313.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme*. 74:636-643.
- Aji, I.M.L. (2009). Development and production of *Lentinula edodes* (Shiitake mushrooms) on inoculated logs of a range of tree species. *Masters Research thesis, Melbourne School of Land and Environment, Forest and Ecosystem Science*. The University of Melbourne.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, A.C. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of allergy and clinical immunology*. 127:701-721.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. A Review. *Cell*. 124:783-801.
- Amaral, A.E., Carbonero, E.R., Simão, R. de C.G., Kadowaki, M.K., Sasaki, G.L., Osaku, C.A., Philip, A.J., Gorina, I., Iacomini, M. (2008). An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. *Carbohydrate Polymers*. 72:473-478.
- Amin, A., Hamza, A.A., Bajbouj, K., Ashraf, S.S., & Daoud, S. (2011). Saffron: A potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 54:857-867.
- Amoussa, A.M.O., Sanni, A., Lagnika, L. (2015). Antioxidant activity and total phenolic, flavonoid and flavonol contents of the bark extracts of *Acacia ataxacantha*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4:172-178.
- Anosike, C.A., Obidoa, O., Ezeanyika, L.U. (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 20:76.

- Aoxue, L., Zhongfu, G., Yijun, F., Aoshuang, L., Ze, C., XingJin, H. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium denneanum*. *Molecules*. 16:1579-1592.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E. (2004). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52:7970-7981.
- Arya, D and Patni, V. (2013). Comparative analysis of *in vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity in methanolic extract of *Pluchea lanceolata* Oliver & Hiern. *In vivo and in vitro: International Journal of Pharmaceutical sciences review and research*. 4:676-680.
- Aslantürk, Ö.S., Aşkın, C.T., Karabey, B., Karabey, F. (2017). Active phytochemical detecting, antioxidant, cytotoxic, apoptotic activities of ethyl acetate and methanol extracts of *Galium aparine* L. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 15:1-16.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-31.
- Ayse, B. (2018). Le cancer du sein chez la jeune femme et sa prise en charge. *Thèse de doctorat. Université de Limoges*. Limoges.
- Azeem, A.K., Dillip, C., Prasanth, S.S., Junice, V., Shahima, H. (2010). Anti-inflammatory activities of Gladular extract of *Thunnus alalunga*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 3:794-796.
- Bachelerie, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A.M., Combadiere, C., Farber, J.M., Graham, G.J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A.H., Locati, M., Luster, A.D., Mantovani, A., Matsushima, K., Murphy, P.M., Nibbs, R., Nomiyama, H., Power, C.A., Proudfoot, A.E.I., Rosenkilde, M.M. Rot, A., Sozzani, S., Thelen, M., Yoshie, O., Zlotnik, A., Ohlstein, E.H. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews*. 66:1-79.
- Baillet, F., Follezou, J.Y., Taillibert, S., Fouret, P., Mazon, J.J., Rixe, O., Renard, A., Delcourt, A., Noë, G., Haertig, A. (2015). Cours de cancérologie niveau DCEM3 2002 - 2003, faculté de médecine, *Université Pierre et Marie Curie*. France. 298p.

- Baralti, Y. (2015). Etude de la toxicité des nanoparticules de l'oxyde de fer chez le rat : analyses mitochondriales et du stress oxydant. *Thèse de doctorat, Université de Strasbourg*. 189p.
- Bartels, H., Böhmer, M., Heierli. (1972). Serum creatinine determination without protein precipitation. *International Journal of Clinical Chemistry*. 37:193-197.
- Becker, D.E. (2013). Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. *Anesthesia Progress*. 60:25-32.
- Békro, Y.A., Békro, J.A.M., Boua, B.B., Tra, B.F.H., Ehilé, E.E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (*Caesalpinaceae*). *Sciences & Nature*. 4:217-225.
- Belhaj, D., Athmouni, K., Ahmed, M.B., Aoiadni, N., El Feki, A., Zhou, J.L., Ayadi, H. (2018). Polysaccharides from *Phormidium versicolor* (NCC466) protecting HepG₂ human hepatocellular carcinoma cells and rat liver tissues from cadmium toxicity: evidence from *in vitro* and *in vivo* tests. *International Journal of Biological Macromolecules*. 113:813-820.
- Bensakhria, A. (2018). Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*: 70-86.
- Benzie, I and Strain J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*. 5:9-19.
- Bishayee, A. (2012). Editorial: recent advances in the prevention and therapy of hepatocellular carcinoma. *Current cancer drug targets*. 12:1043-1044.
- Bleha, R., Třešnáková, L., Sushytskyi, L., Capek, P., Čopíková, J., Klouček, P.; Jablonský, I., Synytsya, A. (2022). Polysaccharides from basidiocarps of the polypore fungus *Ganoderma resinaceum*: Isolation and structure. *Polymers*. 14:255.
- Boudjeko, T., Kanemoto, N.J.E., Woguia, A.L and Njintang, Y.N. (2013). Partial characterization, antioxidative properties and hypolipidemic effects of oilseed cake of *Allanblackia floribunda* and *Jatropha curcas*. *BioMed Central Complementary and*

Alternative Medicine. 13:352.

- Boudjeko, T., Megnekou, R., Woguia, A.L., Mediesse, K.F., Kanemoto, N.E.J., Nounga, T.C.D., Koum, O. (2015). Antioxidant and immunomodulatory properties of cell wall polysaccharides isolated from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L) King and H.E. Robins leaves. *BMC Research Notes*. 8:759.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Analytical Chemistry*. 72:248-254.
- Brand-williams, W., Cuvelier, M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*. 28:25-30.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68:394-424.
- Cai, Q., Li, Y., Pei, G. (2017). Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response. *Journal of Neuroinflammation*. 14:63-70.
- Cannet C. (2004). Artéfacts - Les difficultés de la technique histologique : les gageures de la fixation. *Revue Française d'Histotechnologie*. 17:11-20.
- Cannet C. (2006a). Artéfacts - Les difficultés de la technique histologique : de la circulation à la coupe. *Revue Française d'Histotechnologie*. 19:71-84.
- Cannet C. (2006b). Artéfacts - Les colorations topographiques. *Revue Française d'Histotechnologie*. 19:85-98.
- Carr, B. I. (2016). Hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment. 3rd edition. Springer.
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Frontiers in Immunology*. 9:847.
- Cha, D.S., Eun, J.S., Jeon, H. (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Ethnopharmacology*. 134:305-312.

- Chaitanya, M., Jose, A., Ramalingam, P., Mandal, S.C., Kumar, P.N. (2019). Multi-targeting cytotoxic drug leads from mushrooms. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 12:531-536.
- Chakraborty, N., Banerjee, A., Sarkar, A., Ghosh, S., Acharya, K. (2021). Mushroom polysaccharides: a potent immune-modulator. A review. *Biointerface research in Applied Chemistry*. 11:8915-8930.
- Chang, C.J., Lin, C.S., Lu, C.C., Martel, J., Ko, Y.F., Ojcius, D.M., Tseng, S.F., Wu, T.R., Chen, Y-Y.M., Young, J.D., Lai, H-C. (2015). *G. lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nature Communications*. 6:74-89.
- Chen, G., Dai, Z-K., Liang, R-G., Xiao, S-J., He, S-Q., Zhao, H-L., Xu, Q. (2012). Characterization of diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis in Syrian golden hamsters. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 3:285-292.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X and Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 9:7204-7218.
- Chen, M., Lu, S., Zheng, H., Xu, M., Song, J., Yang, W., Weng, Q., Zheng, L., Fan, X., Cheng, X., Gao, H., Ji, J. (2019). Identification of the potential metabolic pathways involved in the hepatic tumorigenesis of rat diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma via ¹H NMR-based metabolomic analysis. *BioMed Research International*. 1-11.
- Chen, X.Q., Chen, L.X., Li, S.P., Zhao, J. (2017). A new nortriterpenoid and an ergostane-type steroid from the fruiting bodies of the fungus *Ganoderma resinaceum*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 19:1239-1244.
- Chen, X.Q., Chen, L.X., Zhao, J., Tang, Y.P., Li, S.P. (2017). Nortriterpenoids from the Fruiting Bodies of the Mushroom *Ganoderma resinaceum*. *Molecules*. 22:1073.
- Cheung, P.C.K. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*. 2:162-166.
- Chiang, D.Y., Villanueva, A., Hoshida, Y., Philippa, P., Newell, P., Minguéz, B., LeBlanc, A.C. Donovan, D.J., Thung, S.N., Solé, M., Tovar, V., Alsinet, C., Ramos, A.H., Barretina, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Waxman, S., Bruix, J., Mazzaferro, V., Ligon, A.H., Najfeld,

- V., Friedman, S.L., Sellers, W.R., Meyerson, M., Llovet, J.M. (2008). Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*. 68:6779-6788.
- Chopade, A.R., Sontakke, P.M., Sayyad, F.J. (2012). Membrane stabilising activity and protein denaturation: A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Phyllanthus amarus*. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*. 1:67-72.
- Ciemniak, A.A. (2006). comparison of N-nitrosodimethylamine contents in selected meat products. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 57:341-346.
- Cillard, J., Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*. 13:24-29.
- Copray, J.C., Mantingh, I., Brouwer, N., Bibera, K., Küsta B.M, Liem, R.S.B., Huitinga, I., Tilders, F.J.H., Van Dam, A-M., Boddeke, H.W.G.M. (2001). Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *Journal of Neuroimmunology*. 118:203-211.
- Corsini, E., Di Paola, R., Viviani, B., Genovese, T., Mazzon, E., Lucchi, L., Marina, M., Galli, C.L., Cuzzocrea, S. (2005). Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. *Immunology*. 115:253-261.
- Cox, J., Weinman, S. (2016). Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncology*. 3(1): 57– 69.
- Cui, B., Chen, Y., Liu, S., Wang, J., Li, S., Wang, Q., Li, S., Chen, M., Lin, X. (2012). Anti-tumour activity of *Lycium chinensis* polysaccharides in liver cancer rats. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51:314-318.
- Danielson, M., Reinsfelt, B., Westerlind, A., Zetterberg, H., Blennow, K., Ricksten, S.E. (2018). Effects of methylprednisolone on blood-brain barrier and cerebral inflammation in cardiac surgery-a randomized trial. *Journal of Neuroinflammation*. 15:283.
- Delattre, C., Michaud, P., Courtois, B., Courtois, J. (2005). Oligosaccharides engineering from plants and algae applications in biotechnology and therapeutics. *Medicinal Plants for Biotechnology and Biomedicine*. 17:107-17.
- Dhingra, A.K., Chopra, B., Bonthagarala, B. (2018). Natural anti-inflammatory agents: recent progress and future perspectives. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*. 3:1158.

- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida L.M. (1994). Metal chelating activities: inhibition of the complexes ferrozine-ferrous irons. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 315:161-169.
- Dkhil, M.A., Kassab, R.B., Al-Quraishy, S., Abdel-Daim, M.M., Zrieq, R., Abdel Moneim, A.E. (2018). *Ziziphus spinachristi* (L.) leaf extract alleviates myocardial and renal dysfunction associated with sepsis in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 102:64-75.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L.M., Badoc, A., Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, thymelaea lythroides. *Bulletin de la société de Pharmacie de Bordeaux*. 42:61-78.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 4:11-22.
- Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28:350-356.
- Dupré-crochet, S., Erard, M., Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*. 94:657-670.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82:70-77.
- Elmarakby, A.A and Sullivan, J.C. (2012). Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics*. 30:49-59.
- Emran, T.B., Uddin, M.M.N., Rahman M.A, Hossain, M.I., Islam, M.M., Kabir, M.I. (2015). *In vitro* erythrocyte membrane stabilization properties of *Solanum aethiopicum* L. fruit extracts. *Bioresearch Communications*. 1:111-115.
- Fahmy, S.R., Amien, A.I., Abd-Elgleel, F.M., Elaskalany S.M. (2016). Antihepatotoxic efficacy of *Mangifera indica* (L). polysaccharides against cyclophosphamide in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 244:113-120.
- Falcão, T.R., Rodrigues, C.A.O., De Araújo, A.A., De Medeiros, C.A.C.X., Soares, L.A.L., Ferreira, M.R.A., Vasconcelos, R.C., de Araújo Júnior, R.R., De Sousa Lopes, M.L.D., Guerra, G.C.B. (2019). Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex.Tul.) L.P. Queiroz

- leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 19:1-10.
- Fan, S., Zhang, J., Nie, W., Zhou, W., Jin, L., Chen, X., Lu, J. (2017). Antitumor effects of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* against human hepatocellular carcinoma HepG₂ cells. *Food and Chemical Toxicology*. 102:53-62.
- Fathy, A.H., Bashandy, M.A., Bashandy, S.A., Mansour, A.M., Elsadek, B. (2017). Sequential analysis and staging of a diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in male Wistar albino rat model. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 95:1462-1472.
- Fausto, N., Campbell, J. (2010). Mouse Models of Hepatocellular Carcinoma. *Seminars in Liver Disease*. 30:087-098.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*. 11-12:108-115.
- Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises, Elsevier Masson, Paris, France*. 64:390-396.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 136:359- 386.
- Ferretti, E., Pistoia, V., Corcione, A. (2014). Role of Fractalkine/CX3CL1 and Its Receptor in the Pathogenesis of Inflammatory and Malignant Diseases with Emphasis on B Cell Malignancies. *Mediators of Inflammation*. 1-10.
- Florentino, I. F., Silva, D. P. B., Silva, D. M., Cardoso, C. S., Moreira, A. L. E., Borges, C. L., de A. Soares, C.M., Galdino, P.M., Liao, L.M., Ghedini, P.C., Menegatti, R., Costa, E. A. (2017). Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 69:35-44.
- Forrester, S.J., Kikuchi, D.S., Hernandez, M.S., Xu, Q., Griendling, K.K. (2018). Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research*. 122:877-902.
- Frankel, S., Reitman, S. (1957). Dosage des transaminases sériques. *American Journal of*

- Clinical Pathology. 28:56-63.
- Gaascht, F. (2013). Découverte, identification et caractérisation de molécules d'origine naturelle capables de cibler les voies de transduction, de prolifération, d'inflammation et de mort cellulaire dans des cellules cancéreuses. *Thèse de doctorat*. Université de Lorraine.
- Ganeshkumar, M., Ponrasu, T., Subamekala, M.K., Janani, M., Suguna, L. (2016). Curcumin loaded on pullulan acetate nanoparticles protects the liver from damage induced by DEN. *RSC Advances*. 6:5599-5610.
- Global cancer statistics 2021: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*. 68:394-424.
- Gong, P., Wang, S., Liu, M., Chen, F., Yang, W., Chang, X., Liu, N., Zhao, Y., Wang, J., Chen, X. (2020). Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydrate Research*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108037>.
- Grandin, M. (2013). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale. *Thèse de pharmacie*. Université d'Angers. France. 116 p.
- Guerra Dore, C.M.P., Azevedo, T.C.G., de Souza, M.C.R., Rego, L.A., de Dantas, J.C.M., Silva, F.R.F., Leite, E.L. (2007). Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Gaeastrum saccatum* mushroom. *International Immunopharmacology*. 7:1160-1169.
- Guissou, K.M.L, Sanon, E., Sankara, P., Guinko, S. (2014). La mycothérapie au Burkina Faso : État des lieux et perspectives. *Journal of Applied Biosciences*. 79:6896-6908.
- Gulsen, T., Mehmet, O., Mehmet, E.D., Aziz, T. (2015). Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents. *Pharmaceutical biology*. 53:824-830.
- Gupta, C., Vikram, A., Tripathi, D. N., Ramarao, P., & Jena, G. B. (2010). Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. *Phytotherapy Research*. 24:119-128.

- Haioun, A and Zohra, H.F. (2015). Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotecteur contre la toxicité de la Anethume Graveolens. *Mémoire de Master*, Université des Frères Mentouri. Constantine. Algérie. pp:29-36.
- Hajjaj, G. (2017). Screening phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *Matricaria chamomilla l.* et de l'*Ormenis mixta l.* (Asteraceae). *Thèse de Doctorat*. Université Mohammed V. Maroc. 216 p.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*. 62:628-638.
- Halliwell, B and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142:231-255.
- Hanahan, D and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-674.
- Harbone, J.B. (1976). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. *Chapman and Hall*. 78 p.
- Hebatallah, A., Darwish, El-Boghdady, N.A. (2013). Possible involvement of oxidative stress in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis: chemopreventive effect of curcumin. *Journal of Food Biochemistry*. 37:353-361.
- Heindryckx, F., Colle, I., Van Vlierberghe, H. (2009). Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *International Journal of Experimental Pathology*. 90: 367-386.
- Ho, S.C., Liu, J.H., Wu, R.Y. (2003). Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology*. 4:15-18.
- Holanda, B.F., Freitas de Araujo, D., da Silva J.N.R., Pereira, M.G., de Freitas Pires, A., Sampaio Assreuy, A.M. (2020). Polysaccharide-rich extract of *Caesalpinia ferrea* stem barks attenuates mice acute inflammation induced by zymosan: Oxidative stress modulation. *Journal of Ethnopharmacology*. 267:113501.
- Hooshmand, S., Mahdinezhad, M.R., Jamshidi, S.T., Soukhtanloo, M., Mirzavi, F., Iranshahi,

- M., Hasanpour, M., Ghorbani, A. (2021). *Morus nigra* L. extract prolongs survival of rats with hepatocellular carcinoma. *Phytotherapy Research*. 1-12.
- Hoshino, A., Ueha, S., Hanada, S., Imai, T., Ito, M., Yamamoto, K., Matsushima, K., Yamaguchi, A., Limura, T. (2013). Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. *Journal of Cell Science*.126: 1032-45.
- Hu, Y., Zhang, J., Zou, L., Fu, C., Li, P., Zhao, G. (2017). Chemical characterization, antioxidant, immune-regulating and anticancer activities of a novel bioactive polysaccharide from *Chenopodium quinoa* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 99:622-629.
- Hua, D., Zhang, D., Huang B., Yi P., Yan C. (2014). Structural characterization and DPPH radical scavenging activity of a polysaccharide from *Guara* fruits. *Carbohydrate Polymers*. 103: 143-147.
- Hussein, U.K., Mahmoud, H.M., Farrag, A.G., Bishayee A. (2015). Chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted hepatocarcinogenesis in rats by sulfated polysaccharides and aqueous extract of *Ulva Lactuca*. *Integrative Cancer Therapies*. 1-21.
- Hyuna, S., Ferlay, J., Siegel R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal for Clinicians*. 0:1-41.
- Institut National du Cancer (INCA). (2014). Les traitements des cancers du sein. Collection Guides patients Cancer info. Consulté à l'adresse WWW.e-Cancer.fr.
- Isabel, A.A., Diane, E.C. (2010). Superoxide dismutases – a review of the metal-associated mechanism variations. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804:263-274.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Okhura, Y., Ueno, K.A. (1996). Combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water- soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 19:1518-1520.
- Islam, T., Ganesan, K., Xu, B. (2019). New insight into mycochemical profiles and

- antioxidant potential of edible and medicinal mushrooms: A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 21:237-251.
- Jankowski, K and Mincel, M. (2021). Assessment of aggressiveness of *Ganoderma resinaceum* (Boud.) pathogenesis and influence on wood decomposition of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.). *Ecological Engineering & Environmental Technology*. 22:93-100.
- Jian-Hui, X., Dai-Min, X., Dai-Xiong, C., Yu, X., Zong-Qi, L., Jian-Jiang, Z. (2012). Polysaccharides from the medicinal mushroom *Cordyceps taii* show antioxidant and immunoenhancing activities in a D-Galactose-induced aging mouse model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-15.
- Jiao, L., Zhang X., Li B., Liu Z., Wang M., Liu S. (2014b). Anti-tumour and immunomodulatory activities of oligosaccharides isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *International Journal of Biological Macromolecules*. 65:229-233.
- Jones, B., Koch, A.E., Ahmed, S. (2012). Pathological role of fractalkine/CX3CL1 in rheumatic diseases: a unique chemokine with multiple functions. *Frontiers in immunology*. 2:1-9.
- Kadkhodace, M., Khastar, H., Arab, H.A., Ghaznavi, R., Zahmatkesh, M., Mahdavi-Mazdeh, M. (2007). Antioxidant vitamins preserve superoxide dismutase activities in gentamicin-induced nephrotoxicity. *Transplantation proceedings*. 39:864-865.
- Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*. 1:244-257.
- Kang, J., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F., Fukushima, S. (2007). Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis *in vivo*. *Cancer Research*. 67:11141-11146.
- Kannan, M., Muthusamy, P., Venkatachalam, U. (2015). Isolation, structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 3:168-175.
- Kanwal, F., Kramer, J. R., Mapakshi, S., Natarajan, Y., Chayanupatkul, M., Richardson, P. A., Li, L., Desiderio, R., Thrift, A. P., Asch, S. M., Chu, J., & El-Serag, H. B. (2018). Risk

- of Hepatocellular cancer in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 155:1828-1837.
- Kartik, R., Rao, C.V., Trivedi, S.P., Pushpangandan, P., Reddy, G.D. (2010). Amelioration effects against N-nitrosodiethylamine and CCl₄-induced hepato carcinogenesis in Swiss albino rats by whole plant extract of *Achyranthes aspera*. *Indian Journal of Pharmacology*. 42:370-375.
- Katalinić, V., Milos M., Modun D., Musi I., Boban M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*. 86:595-600.
- Katsinelos, P., Lazaraki, G., Anastasiadis, S., Chatzimavroudis, G., Katsinelos, T., Terzoudis, S., Gatopoulou, A., Doulberis, M., Papaefthymiou, A., Kountouras, J. (2019). The impact of selective serotonin receptor inhibitors on post-endoscopic sphincterotomy bleeding, alone or with concurrent aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of Gastroenterology*. 32:614-619.
- Kengni, A.M.B., Mossebo, D.C., Machouart, M.C., Kansci, G., Tsigaing, T.F., Dogang, L.R., Metsebing, B.P., Djifack, N. M. (2014). A new method by correlation to forecast the optimal time of spore-prints production and collection on sporocarps of *Ganoderma resinaceum* Boud. (Basidiomycota) on natural substrate. *Mycosphere*. 5:758-767.
- Khalil, A. (2002). Molecular mechanisms of the protective effect vitamin E against atherosclerosis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 80:662-669.
- Kim, H.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, M.K., Mahmoud, Y., Choi, J.W., Yun, J.W. (2006). Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. *Journal of microbiology and biotechnology*. 165:1240-124.
- Kim, Y.S., Hwang, J.W., Sung, S.H., Jeon, Y.J., Jeong, J.H., Jeon, B.T., Moon, S.H., Park, P.J. (2015). Antioxidant activity and protective effect of extract of *Celosia cristata* L. flower on tert-butylhydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. *Food Chemistry*. 168:572-579.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M.M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L.J.L.D. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*,

- Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 26:144-153.
- Kozarski, M.S., Klaus, A.S., Vunduk, J.D., Jakovljević, D.M., Jadranin, M.B., Nikšić, M.P. (2020). Health impact of the commercially cultivated mushroom *Agaricus bisporus* and the wild-growing mushroom *Ganoderma resinaceum* – A comparative overview. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 85:721-735.
- Lacy, P. (2017). Eosinophil cytokines in allergy. *Cytokine Effector Functions in Tissues*. 173-218.
- Laviolle, B and Bellissant, E. (2006). Les antagonistes du TNF α dans l'insuffisance cardiaque. *La Lettre du pharmacologue*. 20:49-54.
- Le, D., Chen, K., Husain, S., Marathe, A., Haq, M. (2018). Molecular Genetics of Cancer. *International Journal of Human and Health Sciences*. 2:199-208.
- Lee, J.S., Chu, I.S., Mikaelyan, A., Calvisi, D.F., Heo, J., Reddy, J.K., Thorgeirsson, S.S. (2004). Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nature Genetics*. 36:1306-1311.
- Li, A., Shuai, X., Jia, Z., Li H, Liang, Su, D., Guo, W. (2015). *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract inhibits hepatocellular carcinoma growth by downregulating regulatory T cells accumulation and function by inducing microRNA-125b. *Journal of Translational Medicine*. 13:100.
- Li, C., Wu, X., Zhang, H., Yang, G., Hao, M., Sheng, S., Sun, Y., Long, J., Hu, C., Sun, X., Li, L., Zheng, J. (2015). A Huaier polysaccharide restrains hepatocellular carcinoma growth and metastasis by suppression angiogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 75:115-120.
- Li, Y.Q., Fang, L., Zhang, K.C. (2007). Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*. 68:323-328.
- Li, Y-J., Shen, J., Xia, Y-M., Zhang, J., Park, H-S. (2012). The Polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells? *Carbohydrate Polymers*. 90:1210-1215.

- Liochev, S.I. (2013) Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology & Medicine*. 60:1-4.
- Liu, H., Wang, L., Sun, Z., Pang, L., Jia, M., Wu, S., Sun, X., Hao, L., Gao, S., Jia, S., Jia, L. (2012). Production and antioxidant activity of Intracellular polysaccharide by *Hypsizigus marmoreus* SK 01. *BioResources*. 7:5879-5893.
- Liu, J., Willför, S., Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 5:31-61.
- Liu, Q.X., Ba, X., Cao, H., Weng, X., Yang, Y., Wang, B., Zhang, A. (2021). Crude polysaccharides from *Cistanche deserticola* Y.C. Ma as an immunoregulator and an adjuvant for foot-and-mouth disease vaccine. 87:104800.
- Liu, W., Gao, F.F., Li, Q., Lv, J-W., Wang, Y., Hu, P-C., Xiang, Q-M., Wei, L. (2014). Protective effect of *Astragalus* polysaccharides on liver injury induced by several different chemotherapeutics in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15:10413-10420.
- Liu, X., Luo, D., Guan, J., Chen, J., Xu, X. (2022). Mushroom polysaccharides with potential in anti-diabetes: Biological mechanisms, extraction, and future perspectives: A review. *Frontiers in Nutrition*. 9:1087826.
- Liu, Y.J., Shena, J., Xia, Y.M., Zhang, J. (2012). The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells? *Carbohydrate Polymers*. 90:1210-1215.
- Llovet, J.M., Burroughs, A., Bruix, J. (2003). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 362:1907-1917.
- Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., Singal, A.G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., Finn, R.S. (2021). Hepatocellular carcinoma. Nature reviews. *Disease Primers*. 7:6.
- Lloyd, A.L., Barnes, C.W., Held, B.W., Schink, M.J., Smith, M.E., Smith, J. A., Blanchette, R.A. (2018). Elucidating “lucidum”: Distinguishing the diverse laccate *Ganoderma* species of the United States. *PLoS One*. 13:e0199738.

- Mamyrbékova-Békro, J. A., Konan, M. K., Békro Y. A., Djié Bi, M.G., Zomi Bi, T.J., Mambo, V., Boua, B.B. (2008). Phytocompounds of the extracts of four medicinal plants of Côte d'Ivoire and assessment of their potential antioxidant by thin layer chromatography. *European Journal of scientific Research*. 24:219-228.
- Manish, M., Kurt J., Phillip R. (2006). Inducible Nitric Oxide Synthase and apoptosis in murine proximal Tubule Epithelial cells. *Toxicological sciences*. 91: 493-500.
- Mansouri, M.T., Farbood, Y., Sameri, M.J., Sarkaki, A., Naghizadeh, B., Rafeirad, M. (2013). Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chemistry*. 138:1028-1033.
- Mao, G-H., Ren, Y., Li, Q., Wu, H-Y., Jin, D., Zhao, T., Xu, C-Q., Zhang, D-H., Jia, Q-D., Bai, Y-P., Yang, L-Q., Wua, X-Y. (2016). Anti-tumor and immunomodulatory activity of selenium (Se)-polysaccharide from Se-enriched *Grifola frondosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*.82:607-613.
- Mao, R., Zhang, C., Chen, J., Zhao, G., Zhou, R., Wang, F., Xu, J., Yang, T., Su, Y., Huang, J., Wu, Z., Cao, L., Wang, Y., Hu, Y., Yuan, C., Yi, Z., Hong, W., Wang, Z., Peng, D., Fang, Y. (2018). Different levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with unipolar and bipolar depression. *Journal of Affective Disorders*. 237:65-72.
- Marcocci, I., Marguire, J.J., Droy-lefaiz, M.T., Packer L. (1994). The nitric oxide scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 201:748-755.
- Marrero, J.A., Kulik, L.M., Sirlin, C.B., Zhu, A.X., Finn, R.S., Abecassis, M.M., Roberts, L.R., Heimbach, J.K. (2018). Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 68:723-750.
- Matsubara, T., Ono, T., Yamanoi, A., Tachibana, M., Nagasue, A. (2007). Fractalkine-CX3CR1 axis regulates tumor cell cycle and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*. 95:241-249.
- McCord, J and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 244:6049–6055.

- Mebirouk, R. (2017). Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : Activités anti-inflammatoire, anti-tumorale et anti-angiogénique. *Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie.* 172 p.
- Mediesse, K.F., Sipping, K.M.T., Kouamo M.M.F., Obadiah, K., Tassi, Y.S, Mbacham, F.W., Leke, R.G.F. and Boudjeko, T. (2018). Evaluation of *in vitro* antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* C.D.C (Welw) stem bark and *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr leaves. *African Journal of Biotechnology.* ISSN 1684-5315.
- Mehta, J.P., Parmar P.H., Vadia, S.H., Patel M.K., Tripathi C.B. (2017). *In-vitro* antioxidant and *in-vivo* anti-inflammatory activities of aerial parts of Cassia species. *Arabian Journal of Chemistry.* 10:1654-1662.
- Melo, F.H.M. de, Oliveira, J.S., Sartorelli, V.O.B., & Montor, W.R. (2018). Cancer Chemoprevention: Classic and Epigenetic Mechanisms Inhibiting Tumorigenesis. What Have We Learned So Far? *Frontiers in Oncology.* 8:644.
- Michez, D. (2016). Université de Mons. *Eléments de botanique.* P 6.
- Mitchell, J., Tinkey, P.T., Avritscher, R., Van Pelt, C., Eskandari, G., George, S.K, Xiao, L., Cressman, E., Morris, J.S., Rashid, A., Kaseb, A.O., Amin, H.M., Uthamanthil, R. (2016). Validation of a preclinical model of diethylnitrosamine-induced hepatic neoplasia in Yucatan miniature pigs. *Oncology.* 91:90-100.
- Mokh, A., Abdelhady, D., Ghazy, E., Aboumosalem, H., Goda, W. (2019). Sesame oil mitigates initiation stage of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in rats. *Slovenian Veterinary Research.* 56:487-498.
- Money, N.P. (2016). Fungal Diversity. In the Fungi (Third Edition), Chapter 1. *Academic Press, Boston.* 1-36.
- Morel, S., Arnould, S., Vitou, M., Boudard, F., Guzman, C., Poucheret, P., Fons, F., Rapior, S. (2018). Antiproliferative and antioxidant activities of wild *Boletales* mushrooms from France. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 20:13-29.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application

- to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63.
- Mounnissamy, V.M., Kavimani, S., Balu, V., Quine, S.D. (2007). Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of ethanol extract of *Canjara rehedi*. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*. 6:235-237.
- Munteanu, I.C., Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International journal of Molecular Sciences*. 22:3380.
- Murphy, K., Weaver, C. (2016). Janeway's immunobiology 9th Edition. *Garland Science*: New York, New York. ISBN: 978-0815345053. 928 p.
- Navin, P.J and Venkatesh, S.K. (2019). Hepatocellular carcinoma: State of the art imaging and recent advances. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 7:72–85.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*. 49:503-515.
- Nile, S.H and Park, S.W. (2013). Optimized methods for *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 13:95-100.
- Nimse, S.B and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry*. 5:27986-28006.
- Niu, X.M., Li, S.H., Xiao, W.L., Sun, H.D., Che, C.T. (2007). Two new lanostanoids from *Ganoderma resinaceum*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 9:659-664.
- Nyblom, H., Berggren, U., Balldin, J., Olsson, R. (2004). High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. *Alcohol and Alcoholism*. 39:336-339.
- Odebeyi, O.O and Sofowara, F.H. (1978). Antimicrobial alkaloids from a Nigerian Chewing Stick (*Fagara zanthoxyloides*). *Planta Medica*. 36:204-207.
- Oh, J.H., Lee, T.J., Park, J.W., Kwon, T.K. (2008). Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF- κ B in RAW 264.7 cells. *European journal of pharmacology*. 599:11-17.

- Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A., Urushidani, T. (2014). Detection of initiating potential of non-genotoxic carcinogens in a two-stage hepatocarcinogenesis study in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*. 39:785–794.
- Orliaguet, G., Gall and O., Benabess-Lambert, F. (2013). Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*. 17:228-237.
- Ou, Z., Zhao, J., Zhu, L., Huang, L., Ma, Y., Ma, C., Luo, C., Zhu, Z., Yuan, Z., Wu, J., Li, R., Yi, J. (2019). Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 118:109347.
- Oukalha, A., Zekhnini A., Bouhaimi A., Tahrouch, S., Hatimi, A. (2018). Anti-inflammatory activity of methanolic extract from *Pistacia atlantica Desf.* Leaves. *Pharmacognosy Journal*. 10:71-76.
- Oyetayo, O.V. (2011). Medicinal uses of mushrooms in Nigeria: towards full and sustainable exploitation. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*. 8:267-274.
- Pan, K., Jiang, Q., Liu, G., Miao, X., Zhong, D. (2013). Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 55:301-306.
- Pandya, U., Dhuldhaj, U., Sahay, N.S. (2019). Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview. *Natural Product Research*. 33:2668-2680.
- Park, S.J., Jang, J.Y., Jeong, S.W., Cho, Y.K., Lee, S.H., Kim, S.G., Cha, S.W., Kim, Y.S., Cho, Y.D., Kim, H.S., Kim, B.S., Park, S., Bang, H.I. (2017). Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 96:e5811.
- Patel, U., Rajasingh, S., Samanta, S., Cao, T., Dawn, B., Rajasingh, J. (2017). Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. *Drug discovery today*. 22:186-193.
- Paterson, R.M. (2006). *Ganoderma*: A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*. 67:

1985-2001.

- Peng, X.R., Liu, J.Q., Han, Z.H., Yuan X.X., Luo, H.R., Qiu, M.H. (2013). Protective effects of triterpenoids from *Ganoderma resinaceum* on H₂O₂-induces toxicity in HepG₂ cells. *Food Chemistry*. 141:920-926.
- Peng, Y.F., Zhang, L.N., Zeng, F.B., Xu, Y.X. (2003). Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. *Carbohydrate Polymers*. 54:297-303.
- Ping, C.X., Yan, C., ShuiBing, L., YouGuo, C., JianYun, L., LanPing, L. (2009). Free radical scavenging of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats. *Carbohydrate Polymers*. 77:389-93.
- Powers, S.K and Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 88:1243-1276.
- Prin, L., Hachulla, E., Hennache, B., Bonnotte, B., Dubucquoi, S., Abbal, M., Faure, G., Bouletreau. (2009). La réaction inflammatoire. *Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*.
- Prior, R.L., Wu, X., and Schaech, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53: 4290-4302.
- Puigvehí, M., Moctezuma-Velázquez, C., Villanueva, A., Llovet, J.M. (2019). The oncogenic role of hepatitis delta virus in hepatocellular carcinoma. *JHEP Reports*.1:120-130.
- Rajasekaran, D., Elavarasan, J., Sivalingam, M., Ganapathy, E., Kumar, A., Kalpana, K., Sakthisekaran, D. (2011). Resveratrol interferes with N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma at early and advanced stages in male Wistar rats. *Molecular Medicine Reports*. 4:1211-1217.
- Rakhi, S., Daman, S., Dwarakanath, B.S., Madhu, C. (2011). Inhibition of human cervical Cancer Cell Growth by Ethanollic Extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. (Punarnava) Root. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-13.
- Rankin, J.A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. *American Academy of Clinical Neuropsychology Clinical Issues*. 15:3-17.

- Rao, P.S., Mohan, G.K. (2017). *In vitro* alpha-amylase inhibition and *in vivo* antioxidant potential of Momordica dioica seeds in streptozotocin-induced oxidative stress in diabetic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24:1262-1267.
- Re, R., Pellegrini A.A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical of Biological Medicine*. 26:1231-1237.
- Rebouissou, S., and Nault, J.C. (2020). Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*.72:215-229.
- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., Jackson, R. (2012). *Campbell biologie* (9^{ème} édition). Pearson.
- Reuter, S., Subash, C.G., Madan, M. C., Bharat, B.A. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical of Biological Medicine*. 49:1603-1616.
- Roberts, A.W. (2005). G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*. 23:33-41.
- Rohilla, A.A.S. (2012). Alloxan induced diabetes: mechanisms and effects. *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 3:819-823.
- Roquilly, A and Asehnoune, K. (2019). Corticoïdes et sepsis. *Anesthésie & Réanimation*. 5:186-192.
- Roskams, T and Kojiro, M. (2010). Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Seminars in Liver Disease*. 30:017-025.
- Roy, I., Zimmerman, N.P., Mackinnon, A.C., Tsai, S., Evans, D.B., Dwinell, M.B. (2014). CXCL12 chemokine expression suppresses human pancreatic cancer growth and metastasis. *PLoS One*. 9:e90400.
- Ruiz de Galaretta, M., Bresnahan, E., Molina-Sánchez, P., Lindblad, K.E., Maier, B., Sia, D., Puigvehi, M., Miguela, V., Casanova-Acebes, M., Dhainaut, M., Villacorta-Martin, C., Singhi, A.D., Moghe, A., Johann von Felden., Grinspan, L.T., Wang, S., Kamphorst, A.O., Monga, S.P., Brown, B.D., Villanueva, A., Llovet, J.M., Merad, M., Lujambio, A. (2019). β -Catenin activation promotes immune escape and resistance to Anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Discovery*. 9:1124-1141.

- Ruiz-Miyazawa, K.W., Zarpelon, A.C., Pinho-Ribeiro, F.A., Pavão-de-Souza, G.F., Casagrande, R., Verri, W.A. (2015). Vinpocetine reduces carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in mice by inhibiting oxidative stress, cytokine production and NF- κ B activation in the paw and spinal cord. *PLoS One*. 10:e0118942.
- Sabat, R. (2010). IL-10 family of cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 21:315-324.
- Sajon, S.R., Sana, S., Rana, S., Rahman, S.M., Nishi, Z.M. (2018). Mushrooms: Natural factory of anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and nutrition. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7:464-475.
- Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Buffalini, M., Vallorani, L., Casadei, L., Zambonelli, A., Iotti, M., Badalyan, S., Stocchi, V. (2015). Biochemical characterization and antioxidant and antiproliferative activities of different Ganoderma collections. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 25:16-25.
- Samson, M., Aubry, F., Parmentier, M. (1999). Que sont les chimiokines ? *médecine/sciences*. 8-9:966-973.
- Sanchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2:13-22.
- Santos, N.P., Colaço, A.A., Oliveira, PA. (2017). Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. *Tumor Biology*. 1-20.
- Sarveswaran R., Jayasuriya W. J. A. B. N., Suresh T.S. (2017). *In vitro* assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extracts: A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 6:131-141.
- Sauzay, C., Petit, A., Bourgeois, A.M., Barbare, J.C., Chauffert, B., Galmiche, A., Houessinon, A. (2016). Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta*. 463:39-44.
- Savoie, J.M., Minvielle, N., Largeteau, M.L. (2008). Radical-scavenging properties of extracts from the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88:970-975.
- Scherba, V.V and Babitskaya, V.G. (2008). Polysaccharides of xylophilic basidiomycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44:78-83.

- Schumacher, M., Cerella, C., Reuter, S., Dicato, M., Diederich, M. (2010). Anti-inflammatory, pro-apoptotic, and anti-proliferative effects of a methanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract are mediated via modulation of the nuclear factor- κ B pathway. *Genes & Nutrition*. 6:149-160.
- Selvamani, M.D and Thomas, S. (2017). Evaluation of Haematological Abnormalities in Decompensated Chronic Liver Disease Patients. *IOSR-Journal of Dental and Medical Sciences*.16:16-21.
- Shaarawy, S.M., Tohamy, A.A., Elgendy S.M., Elmageed, Z.Y.A., Bahnasy, A., Mohamed, S.M., Kandil, E., Matrougui, K. (2009). Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats' hepatotoxicity. *International Journal of Biological Sciences*. 5:549-557.
- Shaheen, T., Hussien, G., Mekawey, A., Ghalia, H., Youssry, A., El Mokadem, M. (2022). Facile extraction of nanosized β -glucans from edible mushrooms and their antitumor activities. *Journal of Food Composition and Analysis*. 111:104607.doi: 10.1016/j.jfca.2022.104607
- Shen, J., Park, H.S., Xia, Y.M., Kim, G.S., Cui, S.W. (2014). The polysaccharides from fermented *Ganoderma lucidum* mycelia induced miRNAs regulation in suppressed HepG₂ cells[J]. *Carbohydrate Polymers*. 103:319-324.
- Shi, M., Zhang, Z., Yang, Y. (2013). Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydrate polymers*. 95:200-206.
- Shrivastava, S., Singh, N., Nigam, A.K., Chandel, S.S., Shrivastava, R., Kumar, S. (2016). Comparative study of hematological parameters along with effect of chemotherapy and radiotherapy in different stages of breast cancer. *International Journal Research in Medical Sciences*. 5:311-315.
- Silva, A.M., Miranda, A., Fernandes, E., Santos, S., Fraga, I., Santos, D.L., Dias, A.A., Bezerra, R.M: Endopolysaccharides from *Ganoderma resinaceum*, *Phlebia rufa*, and *Trametes versicolor* affect differently the proliferation rate of HepG₂ cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169:1919-1926.
- Singal, A. G., Lampertico, P and Nahon, P. (2020). *Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends*. *Journal of Hepatology*.72:250-261.

- Singh, S., Singh, P.P., Roberts, L.R, Sanchez, W. (2014). Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.1:45-54.
- Singleton, V.L and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal Enology and Viticulture*. 37:144-158.
- Sinha, K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*. 47:389-394.
- So, T.Y., Farrington, E., Absher, R.K. (2009). Evaluation of the accuracy of different methods used to estimate weights in the pediatric population. *Pediatrics*. 123:1045-1051.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*. 11:330-338.
- Solomon, R.T., Aravind, A., Selvi, C.K., Balamurali, R., Ramkumar, G., Muthukumuran, K., VaishnaviPriyaa, C., Kavitha, S., Kayalvizhi, J. (2017). A study on hematological abnormalities in chronic liver diseases. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 16:38-44.
- Song, Y.H., Liu, Q., Lv, ZP., Chen, YY., Zhou, YC., Sun, X.G. (2008). Protection of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza*, a Chinese medicinal herb. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43:170-175.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahoru, T. (2005). Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 11:200-213.
- Sousa, S.G., Oliveira L.A, de Aguiar, M.D., de Brito, T.V., Batista, J.A, Pereira C.M.C., de Souza Costa, M, Neto, J.C.R.M., de Carvalho, F.M., Vasconcelos, D.F.P, da Silva D.A., Barros, F.C.N., Sombra, V.G., Freitas, A.L.P, de Paula, RC.M, de Andrade, F.J.P., dos Reis, B.A.L. (2018). Chemical structure and anti-inflammatory effect of Polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia* Linn (Noni). *Carbohydrate Polymers*. 197:515-523.
- Stancu, C.S., Sanda, G.M., Deleanu, M., Sima, A.V. (2014). Probiotics determine hypolipidemic and antioxidant effects in hyperlipidemic hamsters. *Molecular Nutrition & Food Research*. 58:559-568.
- Stoica, R.M., Moscovici, M., Lakatos, E.S., Cioca, L.I. (2023). Exopolysaccharides of Fungal Origin: Properties and Pharmaceutical Applications. A review. *Processes*.11:335.

- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*. 10:1881-1896.
- Sun H, Yu L, Wei H., Liu, G. (2012). A novel antihepatitis drug, bicyclol, prevents liver carcinogenesis in diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted mice tumor model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-9.
- Tagne, R.S., Telefo, B.P., Nyemb, J.N., Yemele, D., Njina, N.S., Goka, C.M., Lienou, L., Kamd, N.A., Moundipa, F.P., Farooq, D.A. (2014). Activités anticancéreuses et antioxydantes des extraits et fractions au méthanol de quelques plantes médicinales camerounaises. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7:442- 444.
- Taithe, C. (2016). Le lentin du chêne, de sa culture à ses propriétés surprenantes. *Thèse de pharmacie. Université de Poitiers. France*. pp 95.
- Takayama, C., de-Faria, F.M., de Almeida, A.C.A., Dunder, R.J., Manzo, L.P., Socca, E.A.R., Batista, L.M., Salvador, M.J., Souza-Brito, A.R.M., Luiz-Ferreira, A. (2016). Chemical composition of Rosmarinus officinalis essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6:677-681.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew, W.P. (2018). Nutrients and oxidative stress: friend or foe? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-24.
- Teoh, N., Pyakurel, P., Dan, Y. Y., Swisshelm, K., Hou, J., Mitchell, C., Fausto, N., Gu, Y., Farrell, G. (2010). Induction of p53 renders ATM-Deficient mice refractory to hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 138:1155-1165.
- Tien, A.J., Chien, C.Y., Chen, Y-H., Lin, L-C., Chien, C-T. (2017). Fruiting bodies of *Antrodia cinnamomea* and its active triterpenoid, antcin K, ameliorates N-Nitrosodiethylamine-induced hepatic inflammation, Fibrosis and Carcinogenesis in Rats. *The American Journal of Chinese Medicine*. 45:1-26.
- Tinamri, M. et Lagmi, I. (2014). Optimisation des conditions d'extraction des polysaccharides issus d'*Astragalus gombo bunge* (Fabaceae) récolté au Sahara septentrional Est algérien. Mémoire de fin d'étude. 58p.
- Ting, S., Soo, C.K., Fan, Z., Ting, D., Yu-Ying, X., Yi-Fan, Z., Stephen, H., Jamie De

- Stefano., Jun, Y., Li-Hong, X., Xin-Qiang, Z. (2014). Chemoprevention by lipid-soluble tea polyphenols in diethylnitrosamine/phenobarbital-induced hepatic pre-cancerous lesions. *Anticancer Research*. 34:683-694.
- Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M., Weiskirchen, R. (2015). Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Laboratory Animals*. 49:59-69.
- Trease, G.E and Evans, W.C. (1989). Pharmacognosy. 13th Edition. *Bailliere Tindall*. London. pp 683-684.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39:44-48.
- Varghese, C.P., Ambrose, C., Jin, Y.J., Lim., Keisaban, T. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Eurycoma Longifolia* Jack: A traditional medicinal plant in Malaysia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 5:1875-1878.
- Visconti, R and Grieco, D. (2009). New insights on oxidative stress in cancer. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 12:240-245.
- Vora, R.S., Patil, B.R., Pillai, M.M. (2009). Protective effects of *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman ex A/Z/ Hill leaf extract on D-galactose-induced oxidative stress on mouse brain. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47:338-342.
- Wang, J.G., Ma, Z.C., Zhang, L.N., Fang, Y.P., Jiang, F., Phillips, G.O. (2011). Structure and chain conformation of water-soluble heteropolysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*. 86:844-51.
- Wang, Z., Wu, B., Zhang, X., Xu, M., Chang, H., Lu, X., Ren, X. (2012). Purification of a polysaccharide from *Boschniakia rossica* and its synergistic antitumor effect combined with 5-Fluorouracil. *Carbohydrate Polymers*. 89:31-35.
- Wang, Z., Zhao, Y., Su, T., Zhang, J., Wang, F. (2015). Characterization and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharide purified from *Rana chensinensis* skin. *Carbohydrate polymers*. 126:17-22.

- Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immune-modulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:258-274.
- Wen, Z.S., Xiang, X.W., Jin, H.X., Guo, X.Y., Liu, L.J., Huang, Y.N., Qu, Y.L. (2016). Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*. 88:403-413.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A.A. (2005). Practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*. 288:369-376.
- Williams, L.A.D., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J.A., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H., Kraus, W. (2008). The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) Bovine Serum Albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *The West Indian Medical Journal*. 57:327-331.
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł.A., Szukiewicz, D. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation*. 1-19.
- Woo, L.L., Egner, P.A., Belanger, C.L., Wattanawaraporn, R., Trudel, L.J., Croy, R.G., Groopman, J.D., Essigmann, J.M., Wogan, G. N. (2011). Aflatoxin B1-DNA adduct formation and mutagenicity in livers of neonatal male and female B6C3F1 mice. *Toxicological Sciences*. 122:38-44.
- Wu, C., Chen, W., Fang, M., Boye, A., Tao, X., Xu, Y., Hou, S., Yang, Y. (2019). Compound Astragalus and Salvia miltiorrhiza extract inhibits hepatocellular carcinoma progression via miR-145/miR21 mediated Smad3 phosphorylation. *Journal of Ethnopharmacology*. 231:98-112.
- Wu, K., Fan, J., Huang, X., Wu, X., Guo, C. (2018). Hepatoprotective effects exerted by *Poria Cocos* polysaccharides against acetaminophen-induced liver injury in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*. 114:137-142.
- Wu, Q.X., Yu, J.Q., Ying, W., Su, T., Cheng, X.D., Zhao, J., Chen, Y. (2018). Cultivation of the wild *Ganoderma gibbosum* mycelia via the submerged liquid fermentation for

- inter/extra-cellular polysaccharides. *International Journal of Agriculture and Biology*. 20:1218-1224.
- Xiao, J., Xing, F., Huo, J., Fung, M.L., Liong, E.C., Ching, Y.P., Xu, A., Chang, R.C.C., So, K.F., Tiope, G.L. (2014). *Lycium barbarum* polysaccharides therapeutically improve hepatic functions in non-alcoholic steatohepatitis rats and cellular steatosis model. *Scientific reports*. 4:1-12.
- Xiaojuan, H., Xuyan N., Jian, L., Shaohua, X., Aiping, L. (2012). Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides: A Review. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2:15-27.
- Yagi, K. (1976). Simple fluorometric assay for lipoperoxyde in blood plasma. *Biochemical Medicine*. 15:212-216.
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 10:1618.
- Yang, B., Xiao, B., Sun. (2013). Antitumor and immunomodulatory activity of *Astragalus membranaceus* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice. *International Journal of Biological Macromolecules*. 62:287-290.
- Yanglin, H., Bao, Y., Jian T., Zhonghua, M., Qing, G., Mouming Z. (2012). Structural analysis of water-soluble polysaccharides in the fruiting body of *Dictyophora indusiata* and their *in vivo* antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*. 87 (2012) 343–347.
- Ye, L.B., Li, J.R., Zhang, J.S., Pan, Y.J. (2010). NMR characterization for polysaccharide moiety of a glycopeptide. *Fitoterapia*. 81:93-96.
- Yu, Q., Nie, S.P., Wang, J.Q., Huang, D.F., Li, W.J., Xie, M.Y. (2015). Toll-like receptor mediates the antitumor host response induced by *Ganoderma atrum* polysaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63:517-525.
- Yu, Y., Qian, L., Du, N., Liu, Y., Zhao, X. (2017). *Ganoderma lucidum* polysaccharide enhances radiosensitivity of hepatocellular carcinoma cell line HepG₂ through Akt signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 14:5903-5907.
- Zajkowska, M., Mroczko, B. (2021). From allergy to cancer-clinical usefulness of eotaxins. *Cancers*. 13:128.

- Zeghal, K.M and Sahnoun, Z. (2013). La réaction inflammatoire et le stress oxydant. In : *Abrégé de physiologie à l'usage des acupuncteurs et des réflexes thérapeutes. Springer, Paris.* 47-53.
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Gunes, E., Uysal, A., Ceylan, R., Uysal, S., Gungord, H., Aktumsek, A. (2015). Two *Ganoderma* species: profiling of phenolic compounds by HPLC–DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. *Food & Function.* 6:2794-2802.
- Zhang H, Li W. J., Nie, S. P., Chen, Y., Wang, Y. X., Xie, M. Y. (2012). Structural characterisation of a novel bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum*. *Carbohydrate Polymers.* 88:1047-1054.
- Zhang, H., Shang, C., Tian, Z., Amin, H. K., Kassab, R. B., Moneim, A. E. A., Zhang Y. (2020). Diallyl Disulfide suppresses inflammatory and oxidative machineries following carrageenan injection-induced paw edema in mice. *Mediators of Inflammation.* 1-11.
- Zhang, H., Yin, M., Huang, L., Wang, J., Gong, J.L., Sun, B. (2017). Evaluation of the cellular and animal models for the study of antioxidant activity: A review. *Journal of Food science.* 82:278-288.
- Zhang, H.N., He, J.H., Yuan, L., Lin, Z.B. (2003). *In vitro* and *in vivo* protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. *Life Sciences.* 73:2307-2319.
- Zhang, J., Tang, Q., Zhou, C., Jia, W., Da Silva, L., Nguyen, L.D., Reutter, W., Fan, H. (2010). GLIS, a bioactive proteoglycan fraction from *Ganoderma lucidum*, displays anti-tumour activity by increasing both humoral and cellular immune response[J]. *Life Sciences.* 87:628-637.
- Zhang, Z.F., Lv, G.Y., Jiang, X., Cheng, J.H., Fan, L.F. (2015). Extraction optimization and biological properties of a polysaccharide isolated from *Gleostereum incarnatum*. *Carbohydrate Polymers.* 117:185-191.
- Zhao, Y.Q., Jiang, K., Liang, B., Huang, X.Q. (2016). Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF- κ B/p53-apoptosis signaling pathway. *Oncology Reports.* 35:669-675.

- Zhou, Y., Li, Y., Zhou, T., Zheng, J., Li, S., Li, H.B. (2016). Dietary natural products for prevention and treatment of liver cancer. *Nutrients*. 8:1-23.
- Zhou, Y., Qu, Z.Q., Zeng, Y.S., Lin, Y.K. (2012). Neuroprotective effect of preadministration with *Ganoderma lucidum* spore on rat hippocampus. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 64:673-80.
- Zhu, K.X., Nie, S.P., Tan, L.H., Li, C., Gong, D.M., Xie, M.Y. (2016). Polysaccharide from *Ganoderma atrum* improves liver function in Type 2 diabetic rats via antioxidant action and short-chain fatty acids excretion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64:1938-44.
- Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappaf, A., Panayiotidis, M. I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions*. 188:334-339.



Annexes



ANNEXES

Annexe 1 : Origine et culture des lignées cellulaires utilisées

Annexe 1.1 : Origine des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires cancéreuses utilisées dans cette étude sont :

- **La lignée Hela** : Cellules épithéliales dérivées du tissu conjonctif d'un patient atteint du cancer de col de l'utérus.
- **La lignée MDA-MB 231** : Cellules épithéliales du tissu mammaire dépourvues de récepteurs d'œstrogènes.
- **La lignée HepG₂** : Cellules épithéliales dérivées du tissu conjonctif d'un patient atteint de cancer de foie.

Annexe 1.2 : Culture cellulaire

Les lignées cellulaires Hela, MDA-MB 231 et HepG₂ obtenues du NCCS sont maintenues congelées dans l'azote liquide à -196 °C en présence d'un cryoprotecteur (DMSO 10 %). Les cryotubes contenant les cellules ont été laissés 1 à 2 min à TA puis 1 min dans un bain marie à 37 °C. Après la décongélation, les cellules présentes dans les cryotubes ont été transférées dans des tubes de 15 mL sous une hotte de biosécurité de type II. Ensuite, 10 mL de milieu de culture supplémenté de 5 % de FBS (*Fetal Bovine Serum, Invitrogen, USA*) et de solution antibiotique (Himedia : L-Glutamine 200 mM, streptomycine 200 µg/mL et de pénicilline 200 U/mL) ont été ajoutés. Après centrifugation (3000 tr/min ; 5 min ; 25°C), le surnageant a été éliminé et 2 mL de milieu de culture complet ajouté. La suspension cellulaire a été transférée dans des flasques de culture cellulaire stériles (25 cm²) contenant 10 mL de milieu de culture complet. Les cellules ont ainsi été cultivées en monocouche dans les flasques de culture cellulaire maintenues dans un incubateur humide à 37°C, avec 5% de CO₂ jusqu'à confluence des cellules. Une fois la confluence atteinte, le milieu de culture a été éliminé par aspiration à l'aide d'une pipette stérile, puis 3 mL de trypsine ont été ajoutés. La flasque de 25 cm² contenant la trypsine a été incubée (37°C ; 5% de CO₂, 95% d'humidité) pendant 3 à 5 min, puis observée sous un microscope optique pour confirmer le détachement des cellules de leur support. L'effet de la trypsine a été stoppé en rajoutant un volume égal de milieu de culture dans les flasques. La suspension cellulaire contenant la trypsine et le milieu de culture a été transférée dans des tubes de 15 mL et centrifugée (1100 tr/min ; 5 min). Après élimination du surnageant, le culot contenant les cellules a été suspendu dans 2 mL de milieu de culture pour l'obtention d'une suspension cellulaire homogène.

Annexe 2 : Composition de l'aliment des rats

Les animaux utilisés dans la phase expérimentale *in vivo* de cette thèse ont reçu une alimentation dont la composition est la suivante. Pour 25 kg d'aliment nous avons : la farine de maïs (13 kg), le son de blé (3 kg), la farine d'arachides (3 kg), le tourteau de palmistes (2,75 kg), la farine de coquille d'œufs de poule (1 kg), la farine de poisson (2 kg) et le complexe vitaminique (0,25 kg).

Annexe 3 : Préparation des différents milieux de culture

1. Préparation du milieu PDA

Le milieu de culture PDA "Potato Dextrose Agar" est composé de 10 g de glucose, 6 g d'agar, 175 g de pomme de terre et 500 mL d'eau distillée. Après avoir mélangé ces éléments dans un erlenmeyer d'1L, l'ensemble est homogénéisé et stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Le milieu est par la suite refroidi pendant 15 à 40 minutes. Après refroidissement, 40 mg de streptomycine solubilisé à l'alcool sont introduits. Puis, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri de 9 mm.

2. Préparation du milieu MCM

Le milieu MCM "Mushroom Complete Medium" est obtenu après mélange de glucose : 40 g/L, peptone 4 g/L, extrait de malt : 4 g/L, K_2HPO_4 : 1 g/L, KH_2PO_4 : 0,883 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1 g/L à de l'eau distillée (100 mL) dans un erlenmeyer de 500 mL. Après agitation, le milieu est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3. Préparation du milieu de fermentation

Ce milieu est obtenu par dissolution du glucose : 17g, de la peptone : 4 g, du $MnCl_2$ 5mM dans 500 mL d'eau distillée dans un erlenmeyer d'1L. Après agitation, le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 4 : Aspect morpho cultural et croissance du mycélium

1. Aspect morphologique de *Ganoderma resinaceum* sur PDA après 7 jours

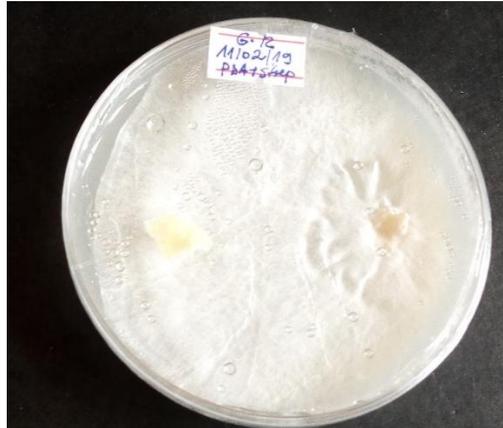
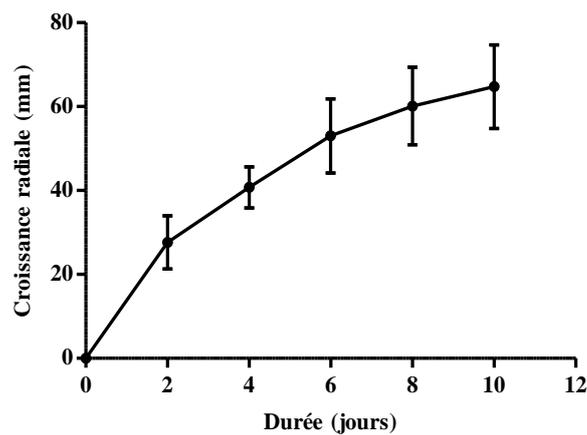


Photo 2 : Mycélium de *G. resinaceum* sur PDA après 7 jours (Sipping, 2019).

2. Croissance radiale du mycélium



3. Aspect cultural de la croissance mycélienne de *Ganoderma resinaceum* en culture submergée après 7 jours



Photo 3 : Culture de *Ganoderma resinaceum* en milieu liquide après 7 jours (Sipping, 2019).

Annexe 5 : Préparation des solutions

Annexe 5.1 : Solutions, réactifs utilisés pour la caractérisation phytochimique

1. Préparation de la solution chlorure ferrique 3%

Cette solution a été obtenue en dissolvant 0,3 g de chlorure de fer III (FeCl_3) dans 10 mL d'eau distillée. Cette solution a servi à la mise en évidence des composés phénoliques dans les extraits.

2. Préparation de la solution d'ammoniaque diluée à $\frac{1}{2}$

Cette solution a été préparée par dilution de 12,5 mL de solution stock d'ammoniaque (33%) dans 12,5 mL d'eau distillée puis homogénéisation. Elle a été utilisée pour la mise en évidence des flavonoïdes et des anthocyanines dans les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

3. Préparation de la solution de HCl 1%

Cette solution a été préparée par dilution de 100 μL de solution stock d'acide chlorhydrique dans 10 mL d'eau distillée puis homogénéisation. Elle a été utilisée pour la mise en évidence des alcaloïdes dans les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

4. Préparation du réactif Stiasny

Le réactif de Stiasny est reconstitué par mélange de 25 mL de formol 40% à 25 mL d'acide chlorhydrique 1N. Il a été utilisé pour la mise en évidence des tanins dans les extraits.

5. Préparation du Réactif de Bradford

Le réactif de Bradford a été préparé par dissolution de 50 mg de Bleu de Coomassie G250 dans 25 mL d'éthanol 95%. Après 30 min d'agitation, 50 mL d'acide orthophosphorique 85% ont été ajoutés au mélange. Ce dernier est ensuite agité pendant 10 min puis le volume de la solution a été complété à 500 mL avec de l'eau distillée, puis filtré et conservé à 4°C pour le dosage des protéines.

6. Préparation du réactif de Folin-Ciocalteu

Pour obtenir une solution de concentration 0,2 N ; 5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu de la solution stock de concentration 2 N ont été prélevés et introduits dans une fiole jaugée. Le volume a été complété à 50 mL avec l'eau distillée puis homogénéisé. Cette solution a été utilisée pour le dosage des composés phénoliques.

7. Préparation de la solution de Na_2CO_3 20%

La solution de Na_2CO_3 20 % a été préparée par dissolution de 4 g de poudre de Na_2CO_3 dans 20 mL d'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour le dosage des composés phénoliques.

Annexe 5.2. Solutions, réactifs utilisés pour l'évaluation des activités antioxydantes

1. Préparation du Réactif DPPH

Le réactif DPPH 400 μM a été préparé par dissolution de 3,95 mg de DPPH dans 25 mL de méthanol 65°C.

2. Préparation du Réactif ABTS

Le réactif ABTS a été préparé en mélangeant 20 mL d'une solution d'ABTS 7 mM à 20 mL, d'une solution de permanganate de potassium (KMnO_4) 4,9 mM afin de favoriser l'oxydation de l'ABTS. Le mélange a ensuite été conservé à l'obscurité pendant 15 h.

3. Préparation de la solution de chlorure de fer II 2 mM

La solution de chlorure de fer II 2 mM a été préparée par dissolution de 0,013 g de chlorure de fer II anhydre dans 50 mL d'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour le test de chélation des ions ferreux.

4. Préparation de la solution de ferrozine 5 mM

La solution de ferrozine 5 mM a été préparée par dissolution de 0,025 g de ferrozine anhydre dans 10 mL d'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour le test de chélation des ions ferreux.

5. Préparation de la solution de chlorure ferrique 10 mM

La solution de chlorure ferrique 10 mM a été préparée par dissolution de 0,081 g de chlorure de fer III anhydre dans 50 mL d'eau distillée. Cette solution a été utilisée pour l'évaluation du pouvoir réducteur du fer.

6. Préparation du réactif de FRAP

Le réactif de FRAP a été préparé par mélange de 50 mL de tampon acétate 300 mM, pH 3,6 avec 5 ml d'une solution de TPTZ 10 mM dans 400 mM de HCl et 5 mL d'une solution de chlorure ferrique 10 mM. Ce réactif a été utilisé pour l'évaluation du pouvoir réducteur du fer.

7. Le réactif de Griess

Le réactif de Griess a été reconstitué par ajout de 250 mL d'eau distillée stérile dans le flacon contenant le réactif sous forme de poudre (1x Griess Reagent, Sigma Aldrich, Catalog Number G4410-10G). Le réactif a ensuite été conservé à température ambiante et utilisé pour le test de piégeage de l'oxyde nitrique.

Annexe 5.3. Solutions, réactifs utilisés pour l'évaluation des activités anti inflammatoires

1. Préparation de la solution isosaline

La solution saline de chlorure de sodium 0,9% a été préparée en mélangeant 4,5 g de chlorure de sodium à 500 mL d'eau distillée. Cette solution est utilisée lors des tests de stabilisation de la membrane des érythrocytes murins.

2. Préparation de la solution d'albumine d'œuf 1mM

La solution d'albumine d'œuf 1mM a été préparée par dissolution de 4,5 g de poudre d'albumine de l'œuf dans 100 mL d'eau distillée. Cette solution est utilisée lors du test d'inhibition de la dénaturation des protéines.

3. Préparation de la solution k-carraghénine 1%

La solution de k-carraghénine 1% a été obtenue en dissolvant 1 g de poudre de k-carraghénine dans 100 mL de solution isosaline. Cette solution a été utilisée pour induire l'inflammation aigüe chez les rats.

Annexe 5.4. Solutions, réactifs utilisés pour l'évaluation des activités antitumorales

1. Préparation de la solution de N-diéthylnitrosamine

La solution de N-diéthylnitrosamine (DEN) a été administrée pour induire l'hépatocarcinome chez les rats mâles de souche Wistar âgés de 05 semaines à la dose de 100 mg/kg PC. La solution de travail a été obtenue par dilution de la solution stock (0,94g/mL) soit 0,6 mL dans 25 mL de solution saline (0,9%).

2. Préparation de la solution de phénobarbital

Le phénobarbital 0,1% a été utilisé comme promoteur. La solution de travail est obtenue par dilution de 0,1 g de poudre de phénobarbital dans 100 mL d'eau distillée.

Annexe 5.5. Solutions et réactifs utilisés pour le dosage de quelques paramètres du stress oxydant *in vivo*

1. Préparation de la solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,37 %.

La solution de TBA 0,37% a été obtenue par dissolution de 0,37 g de TBA dans une fiole jaugée (100 mL) contenant 5 mL d'eau distillée et le volume final a été complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

2. Préparation de la solution d'acide trichloracétique (TCA) 15 %

La solution de TCA 15% a été préparée en dissolvant 7,5 g de TCA dans une fiole jaugée (50 mL) contenant 20 mL d'eau distillée et le volume final a été complété à 50 mL avec de l'eau distillée.

3. Préparation de la solution de HCl 0,25 N

La solution de HCl 0,25 N a été obtenue par un mélange de 1,04 mL de HCl 0,25 N dans une fiole jaugée de 50 mL à 5 mL d'eau distillée et le volume final a été complété à 50 mL avec de l'eau distillée.

4. Préparation de la solution TCA-TBA-HCl

La solution TCA-TBA-HCl est la solution de travail dans le dosage du malondialdéhyde. Elle a été obtenue par le mélange des solutions de TBA, TCA et HCl dans les proportions 1:1:1.

5. Préparation de la solution de la solution de dichromate de potassium 5%

La solution de dichromate de potassium 5% a été obtenue par dissolution de 5 g de poudre de dichromate de potassium dans 100 mL d'eau distillée.

6. Préparation du réactif d'Ellman

Le réactif d'Ellman a été obtenu en dissolvant 4,96 mg d'acide 2,2 dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) dans une fiole jaugée de 250 mL contenant 100 mL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) et le volume final a été complété à 250 mL avec du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5). Ce réactif a été utilisé lors du dosage du glutathion réduit.

Annexe 5.6. Solutions tampons

1. Préparation du tampon acétate 300 mM ; pH 3,6

La solution de tampon acétate a été obtenue par dissolution de 4,92 g d'acétate de sodium dans 160 mL d'eau distillée, puis réajustement du pH à 3,6 avec de l'acide acétique glacial 99,5%. Le volume a été complété à 200 mL avec de l'eau distillée. Cette solution a servi pour l'évaluation du pouvoir réducteur du fer.

2. Préparation du tampon phosphate sodium (0,1 M ; pH 7,5)

Le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5 a été préparé en dissolvant 1,74 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 1,57 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) dans 200 mL d'eau distillée. Cette solution tampon est utilisée pour la préparation des homogénats d'organes et l'évaluation de l'activité de la catalase.

3. Préparation du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5)

Cinq cent millilitres de tampon phosphate 0,1M à pH 6,5 ont été préparés en mélangeant 1,22 g de K_2HPO_4 et 5,85 g de KH_2PO_4 dans 500 mL d'eau distillée.

4. Préparation du tampon carbonate de sodium (0,05 M ; pH=10,2)

Le tampon carbonate 0,05 M de pH 10,2 a été préparé en mélangeant 0,435 g de $NaHCO_3$ et 0,343 g de Na_2CO_3 dans 520 mL d'eau distillée. Ce tampon est utilisé pour mesurer l'activité de la SOD.

Annexe 5.7. Solutions utilisées pour l'évaluation de l'activité des transaminases

1. Préparation de la solution de travail pour ALAT

➤ Préparation de la solution de pyruvate de sodium (C=0,022 mg/mL ; V= 50 mL)

La solution de pyruvate de sodium a été obtenue par dissolution de 1,1 mg de poudre de pyruvate de sodium dans 50 mL d'eau distillée.

➤ Préparation de la solution de substrat ALAT

Cette solution a été obtenue par dissolution de la L-Alanine (0,89 g) et de l' α -cétoglutarate (0,03 g) dans 50 mL de tampon phosphate (0,1M; pH 7,4).

➤ Préparation du réactif de coloration

Il a été préparé en dissolvant 0,01 g de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans 4,125 mL de HCl (1 N). Le mélange a été complété à 50 mL par de l'eau distillée.

➤ Préparation e la solution de soude (C=0,4N ; V=250 mL)

Elle a été obtenue en dissolvant 4 g de NaOH dans 250 mL d'eau distillée.

2. Préparation de la solution de travail pour ASAT (Kit Chronolab)

Elle a été obtenue en mélangeant dans les proportions 1:1 le réactif R1 [tampon Tris HCl (80 mmol/L ; pH 7,8 + L-Aspartate (200 mmol/L) + α -cétoglutarate (1,2 mmol/L)] au réactif R2 [NADH 0,22 mmol/L ; Malate déshydrogénase (600-900 U/L)].

Annexe 5.8. Solutions et colorants utilisés pour les coupes histologiques

Les solutions et colorants ci-après ont été préparés avec de l'eau distillée et/ou avec de l'alcool absolu ou de l'éthanol concentré à 95%.

1. Le formol à 10 % a été préparé à partir du formol commercial (37%). Pour un volume final de 1000 mL, un volume initial de 270,27 mL de formol commercial a été introduit dans une éprouvette graduée et le volume final a été atteint par ajout d'eau distillée.

2. Les solutions d'alcool à 50, 70 et 80% ont été obtenues par dissolution de l'éthanol à 95 % ou de l'alcool absolu d'après la table de Gay - Lussac (voir annexe 6).

3. L'hématoxyline de Harris est un colorant nucléaire. Dans un erlenmeyer, ont été introduits 1 mg d'hématoxyline, 10 mL d'alcool absolu, 20 g d'alun potassique dissous à chaud et 0,5 g d'oxyde de mercure rouge. Le volume final du mélange a été complété à 200 mL avec de l'eau distillée. Le mélange obtenu est porté à ébullition puis refroidi et filtré. La solution recueillie est la solution d'hématoxyline de Harris.

4. L'éosine alcoolique à 0,5% est un colorant cytoplasmique.

Pour préparer 1 L de cette solution, 5 g d'éosine ont été solubilisé dans 950 mL d'éthanol absolu. Le volume a été complété à 1 L avec de l'eau distillée.

5. La solution d'eau gélatinée permet l'étalement des coupes histologiques et une bonne adhésion de celles-ci sur les lames. Cinq grammes de poudre de gélatine ont été dissous dans 1 L d'eau distillée chauffée à 45°C.

6. La solution saturée d'eau lithinée est utilisée pour renforcer la coloration nucléaire.

Elle est préparée par dissolution de 10 mg de carbonate de lithium dans un bécher contenant 300 mL d'eau distillée. La solution obtenue a été filtrée avant d'être utilisée.

7. La solution aqueuse de vert lumière à 2% a été obtenue par le mélange de 25 mL de solution aqueuse de vert lumière dans une fiole jaugée (1000 mL) avec 50 mL d'éthanol à 95% et le volume final complété à 1000 mL avec de l'éthanol à 95%.

8. La solution de brun Bismarck à 0,5% a été obtenue par dissolution de 0,5 g de brun Bismarck dans une fiole jaugée (100 mL) avec 5 mL d'éthanol à 95% et le volume final a été complété à 100 mL avec de l'éthanol à 95%.

9. La solution d'EA-65 a été obtenue par le mélange, dans une éprouvette, de 450 mL de vert lumière à 0,02 %, 100 mL de brun Bismarck à 0,5 % et 450 mL de solution d'éosine à 0,5%. Six grammes d'acide phosphotungstique ont ensuite été dissous dans le mélange.

10. La solution d'éthanol / xylène est obtenue par mélange de l'éthanol absolu avec du xylène (1:1).

Annexe 6 : Table de Gay - Lussac

La table de Gay- Lussac, encore appelé table de mouillage de l'alcool, est utilisée pour la dilution de l'alcool.

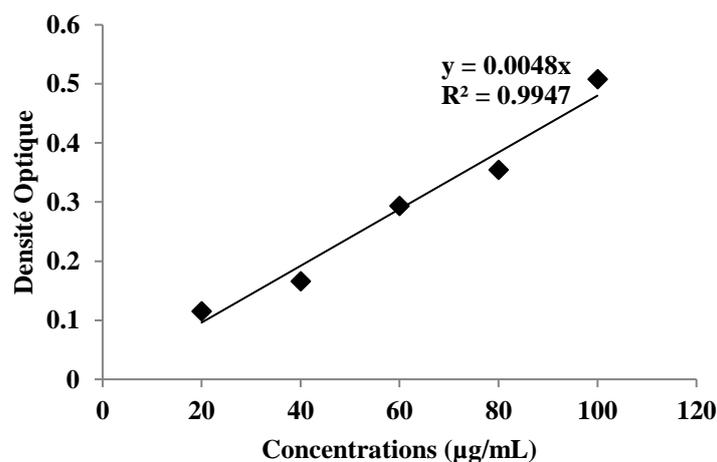
		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100 mL d'alcool de concentration initiale X (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

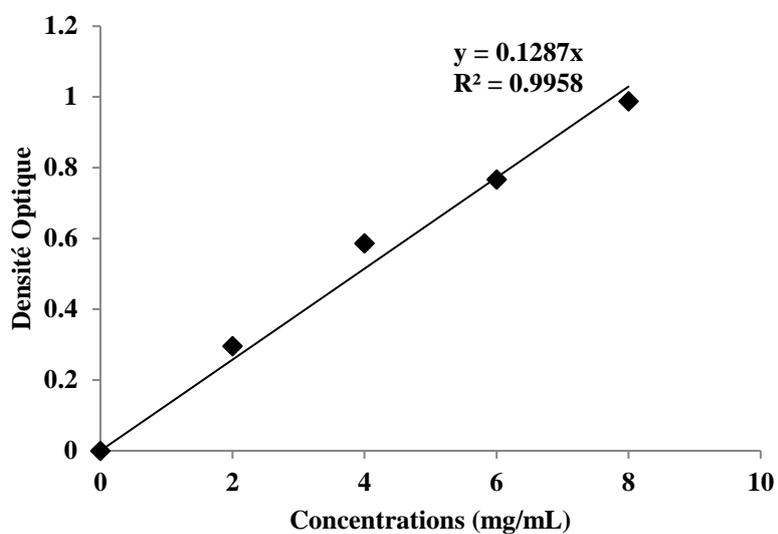
Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 mL d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Annexe 7 : Courbes d'étalonnage

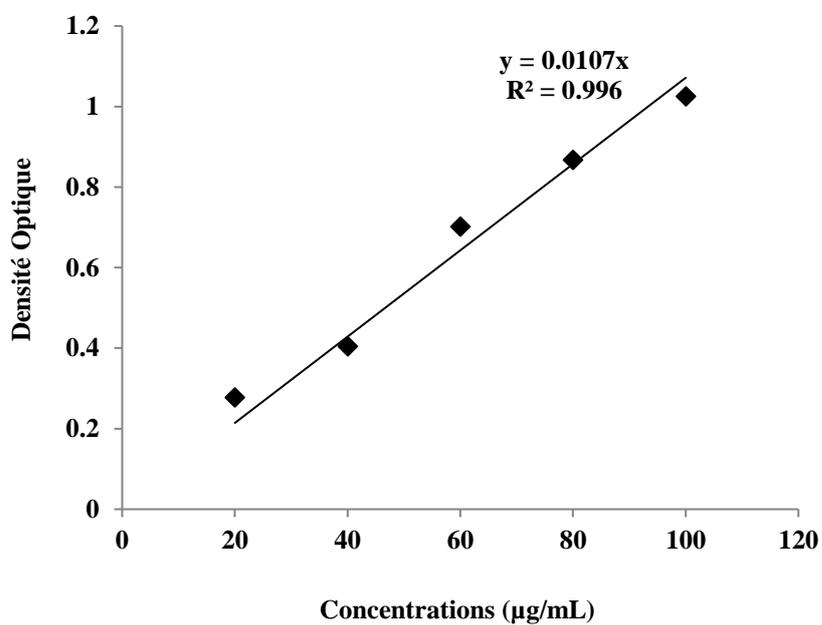
1. Courbe d'étalonnage des protéines *in vitro*



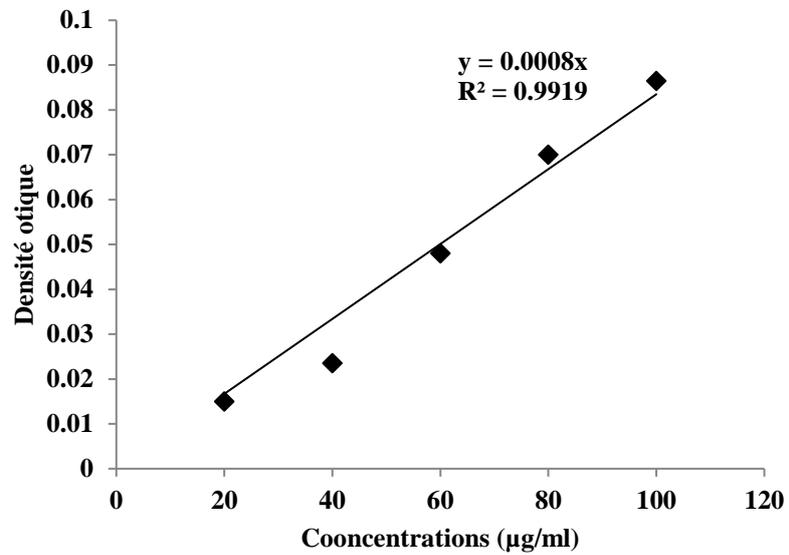
2. Courbe d'étalonnage des protéines *in vivo*



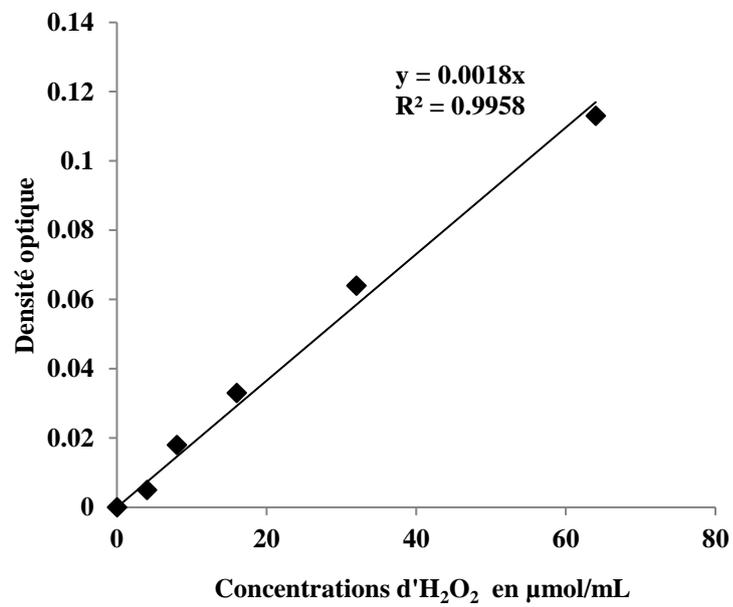
3. Courbe d'étalonnage des composés phénoliques



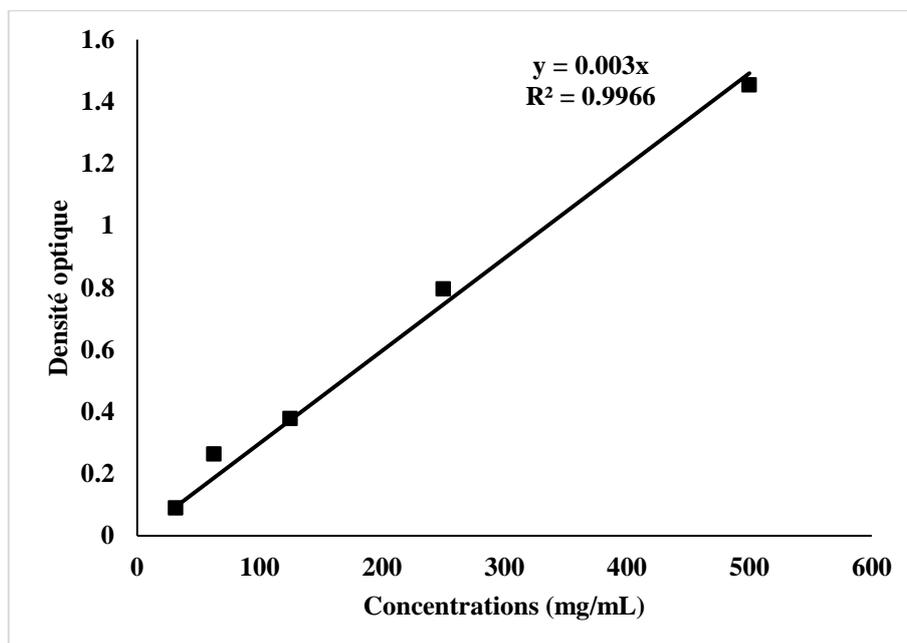
4. Courbe d'étalonnage des sucres totaux



5. Courbe d'étalonnage de l'activité de la catalase



6. Courbe d'étalonnage de l'oxyde nitrique



Annexe 8 : Tableaux récapitulatifs des activités anti-radicalaires et antioxydantes des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

1. Tableau récapitulatif des activités anti-radicalaires DPPH

% DPPH réduit						
Extraits polysaccharidiques						
(µg/mL)	EPS I	EPS II	GRP I	GRP II	MYC	GRT
25	48,85 ± 2,59 ^d	55,47 ± 2,69 ^c	66,13 ± 2,59 ^b	56,22 ± 2,72 ^{cd}	42,25 ± 3,08 ^{de}	32,98 ± 1,87 ^f
50	53,01 ± 4,62 ^d	62,41 ± 2,36 ^b	69,88 ± 1,36 ^b	58,89 ± 0,42 ^c	41,13 ± 4,53 ^e	40,99 ± 2,55 ^e
100	55,77 ± 0,59 ^{cd}	58,34 ± 1,56 ^b	69,11 ± 0,71 ^b	59,83 ± 3,09 ^c	41,41 ± 2,01 ^e	39,94 ± 1,73 ^e
150	57,89 ± 1,03 ^b	59,70 ± 0,18 ^b	74,04 ± 0,38 ^a	59,94 ± 1,28 ^c	45,12 ± 2,80 ^d	38,61 ± 3,42 ^e
200	70,81 ± 3,87 ^a	74,52 ± 1,91 ^a	77,35 ± 2,89 ^a	77,86 ± 2,10 ^a	45,91 ± 2,08 ^d	38,02 ± 3,60 ^e

Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e > f$).

2. Tableau récapitulatif des activités anti-radicalaires ABTS

% ABTS réduit						
Extraits polysaccharidiques						
(µg/mL)	EPS I	EPS II	GRP I	GRP II	MYC	GRT
25	37,24 ± 0,83 ^d	41,09 ± 3,07 ^c	39,08 ± 1,52 ^{cd}	38,50 ± 0,80 ^d	12,53 ± 1,68 ^f	15,45 ± 2,76 ^f
50	42,15 ± 0,71 ^c	42,42 ± 2,54 ^c	40,15 ± 2,29 ^c	40,35 ± 1,96 ^c	18,37 ± 1,55 ^e	19,93 ± 2,09 ^e
100	41,45 ± 1,29 ^c	41,60 ± 1,20 ^c	41,11 ± 1,59 ^c	46,30 ± 4,72 ^b	37,68 ± 2,33 ^d	41,54 ± 3,78 ^c
150	39,45 ± 1,90 ^{cd}	42,65 ± 1,20 ^c	42,96 ± 1,23 ^c	47,66 ± 0,83 ^b	36,56 ± 1,87 ^d	43,41 ± 0,93 ^c
200	40,00 ± 0,94 ^{cd}	45,96 ± 1,49 ^b	43,91 ± 0,46 ^c	56,98 ± 1,72 ^a	49,67 ± 1,17 ^b	48,76 ± 1,39 ^b

Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e > f$).

3. Tableau récapitulatif de l'activité chélatrice des ions ferreux

% chélation Fe ²⁺						
Extraits polysaccharidiques						
(µg/mL)	EPS I	EPS II	GRP I	GRP II	MYC	GRT
25	5,40 ± 0,38 ^h	5,56 ± 0,76 ^h	6,31 ± 2,02 ^h	9,28 ± 1,15 ^g	30,03 ± 0,20 ^d	25,62 ± 3,85 ^d
50	6,97 ± 1,23 ^h	8,00 ± 0,86 ^g	8,94 ± 0,87 ^g	12,52 ± 0,71 ^f	35,8 ± 4,13 ^c	37,49 ± 0,76 ^c
100	7,50 ± 0,25 ^g	11,38 ± 1,24 ^f	13,95 ± 1,37 ^f	19,23 ± 2,44 ^e	40,50 ± 3,50 ^c	31,93 ± 3,35 ^d
150	18,50 ± 0,36 ^a	22,63 ± 1,50 ^c	46,25 ± 0,28 ^b	48,04 ± 1,88 ^b	46,87 ± 2,73 ^b	41,94 ± 3,38 ^c
200	44,49 ± 1,48 ^{bc}	47,92 ± 1,88 ^b	46,63 ± 1,04 ^b	51,95 ± 0,45 ^a	50,76 ± 4,27 ^a	51,21 ± 4,00 ^a

Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e > f > g > h$).

4. Tableau récapitulatif du pouvoir réducteur du fer

FRAP (EAG/mg)						
Extraits polysaccharidiques (200 µg/mL)						
EPS I	EPS II	GRP I	GRP II	MYC	GRT	
16,65 ± 0,54 ^c	1,10 ± 0,27 ^e	8,05 ± 1,61 ^d	6,90 ± 0,54 ^d	25,22 ± 4,61 ^b	7,46 ± 0,73 ^a	

Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e$).

5. Tableau récapitulatif de l'activité de piégeage de NO

% NO						
Extraits polysaccharidiques						
(µg/mL)	EPS I	EPS II	GRP I	GRP II	MYC	GRT
25	4,56 ± 0,97 ^h	9,24 ± 1,38 ^g	32,90 ± 2,01 ^c	27,45 ± 1,56 ^d	18,42 ± 3,96 ^e	22,18 ± 4,02 ^e
50	15,80 ± 2,43 ^f	8,56 ± 1,43 ^g	40,45 ± 3,18 ^b	29,59 ± 2,64 ^d	15,30 ± 1,28 ^f	23,68 ± 2,32 ^{de}
100	16,35 ± 3,36 ^f	16,61 ± 1,04 ^f	43,41 ± 2,34 ^b	35,11 ± 1,85 ^a	15,13 ± 3,46 ^f	24,47 ± 3,58 ^{de}
150	39,92 ± 3,91 ^{bc}	33,68 ± 3,40 ^c	57,66 ± 3,27 ^a	59,20 ± 2,85 ^a	16,79 ± 2,56 ^f	23,67 ± 5,72 ^d
200	36,57 ± 3,54 ^c	36,33 ± 2,9 ^c	62,83 ± 2,45 ^a	63,45 ± 0,60 ^a	17,27 ± 1,57 ^f	40,32 ± 3,31 ^b

Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e > f > g > h$).

Annexe 9 : Tableaux récapitulatifs des activités anti-inflammatoires des extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

1. Tableau récapitulatif de l'inhibition de l'hémolyse de la membrane des érythrocytes

% inhibition						
Extraits polysaccharidiques						
(µg/mL)	EPS I	EPS II	GRP I	GRP II	MYC	GRT
100	26,90 ± 1,95 ^h	35,07 ± 4,28 ^f	22,77 ± 2,20 ^h	48,51 ± 1,96 ^e	1,48 ± 1,13 ^k	9,38 ± 0,57 ^j
200	30,93 ± 1,13 ^g	46,79 ± 4,04 ^e	40,34 ± 3,55 ^c	53,13 ± 3,78 ^{de}	2,69 ± 0,86 ^b	7,95 ± 3,89 ^j
300	34,77 ± 0,42 ^f	52,35 ± 0,31 ^e	47,25 ± 8,60 ^e	64,17 ± 2,17 ^c	9,73 ± 1,06 ^j	9,20 ± 0,97 ^j
400	36,60 ± 2,58 ^f	57,82 ± 2,17 ^d	70,99 ± 0,80 ^b	73,00 ± 1,63 ^a	9,48 ± 3,07 ^j	14,03 ± 1,84 ⁱ
500	49,49 ± 2,59 ^e	62,06 ± 1,59 ^c	69,46 ± 5,16 ^b	74,07 ± 2,71 ^a	9,38 ± 0,57 ^j	13,81 ± 1,42 ⁱ

Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ ($a > b > c > d > e > f > g > h > i > j > k$).

2. Tableau récapitulatif de l'inhibition de la dénaturation des protéines

% inhibition						
Extraits polysaccharidiques						
(µg/mL)	EPS I	EPS II	GRP I	GRP II	MYC	GRT
100	59,22 ± 1,73 ^a	59,69 ± 1,86 ^a	57,61 ± 1,65 ^c	57,69 ± 0,21 ^b	13,68 ± 1,19 ^d	13,20 ± 2,80 ^d
200	59,39 ± 2,34 ^a	56,80 ± 3,19 ^b	58,70 ± 1,00 ^b	58,64 ± 1,09 ^b	14,83 ± 0,86 ^d	15,47 ± 3,22 ^d
300	59,72 ± 1,64 ^a	59,89 ± 0,95 ^a	58,50 ± 1,17 ^b	57,56 ± 2,27 ^b	14,98 ± 2,54 ^d	20,62 ± 3,78 ^c
400	59,59 ± 1,44 ^a	60,81 ± 2,55 ^a	59,00 ± 1,04 ^a	63,60 ± 3,17 ^a	16,79 ± 2,56 ^b	22,24 ± 3,78 ^c
500	60,94 ± 2,92 ^a	60,25 ± 2,25 ^a	59,34 ± 1,41 ^a	64,03 ± 1,17 ^a	22,49 ± 2,81 ^c	22,70 ± 3,03 ^c

Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ ($a > b > c > d$).

Annexe 10 : Tableau récapitulatif des pourcentages d'inhibition de la prolifération des lignées cellulaires par les extraits polysaccharidiques de *G. resinaceum*.

Pourcentage d'inhibition de la prolifération (%)				
<i>Hela</i>				
	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
GRP I	6,62 ± 2,96	13,08 ± 4,70	20,98 ± 2,92	31,45 ± 0,70
GRP II	10,77 ± 2,23	18,17 ± 2,65	29,92 ± 0,37	36,20 ± 3,11
<i>MDA-MB 231</i>				
GRP I	37,77 ± 0,22	41,97 ± 2,92	50,67 ± 6,18	59,24 ± 5,75
GRP II	38,32 ± 6,13	44,13 ± 1,81	56,22 ± 2,88	57,72 ± 0,11
<i>HepG₂</i>				
GRP I	8,81 ± 6,15	19,91 ± 4,45	26,95 ± 6,20	36,85 ± 5,30
GRP II	12,68 ± 7,42	25,36 ± 4,72	40,39 ± 2,26	41,50 ± 1,56

GRP I & GRP II (extraits polysaccharidiques issus des carpophores de *G. resinaceum*)



**Liste des
publications issues
de la thèse**



Annexe 11 : Liste des Publications issues de la thèse

Sipping, K.M.T., Mediesse, K.F., Kenmogne, L.V., Kanemoto, J.E.N., Njamen, D., Boudjeko, T. (2022). Polysaccharide-rich fractions from *Ganoderma resinaceum* (*Ganodermatacae*) as chemopreventive agents in N-diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in Wistar rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID: 8198859.

Sipping, K.M.T., Mediesse, K.F., Sombes, A.Y.N., Mfopa, A., Boudjeko, T. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory activities of different extracts from *Ganoderma resinaceum* (Boud) fruiting bodies. *Journal of Herbmmed Pharmacology*. 11(3):348-359. doi: 10.34172/jhp.2022.40.

Annexe 22 : Communications orales et Présentations posters

Sipping K.M.T., Njamen D., Boudjeko T. (2022). *Ganoderma resinaceum* polysaccharides fractions' from different sources prevent hepatocarcinoma through alleviating oxidative stress and inflammation. **Communication orale présentée à la 29^{ème} conférence annuelle du Comité Camerounais des Biosciences (CCB) du 01^{er} au 03 Décembre 2022 à l' Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des Plantes Médicinales à Yaoundé au Cameroun.**

Sipping K.M.T., Mediesse K.F., Sombes A.Y.N., Mfopa A., Boudjeko T. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory activities of different extracts from *Ganoderma resinaceum* (Boud) fruiting bodies. **Communication orale présentée à la 28^{ème} conférence annuelle du Comité Camerounais des Biosciences (CCB) à l'Université de Dschang au Cameroun.**

Sipping K.M.T., Njamen D., Boudjeko T. (2021). Polysaccharide rich fractions from *G. resinaceum* as potent anti-oxidant and chemopreventive agents against DEN induced Hepatocellular carcinoma in Male Wistar rats. **Communication Poster présentée au 4^{ème} meeting international EPNOE junior organisée à KU LEUVEN en Belgique.**

Sipping K.M.T., Mediesse K.F., Kanemoto N.J.E., Njamen D., Boudjeko T. (2020). Anti-oxidant and Anti-tumor promoting effects of polysaccharide fractions from *Ganoderma resinaceum* against Diethylnitrosamine induced Hepatocellular carcinoma in Wistar rats. **Communication Poster présentée à la 24^{ème} conférence annuelle du Comité Camerounais des Biosciences (CCB) à l'Université de Yaoundé I au Cameroun.**

Sipping K.M.T., Njamen D., Boudjeko T. (2020). Anti-tumor promoting effects of polysaccharides from *Ganoderma resinaceum* against Diethylnitrosamine induced Hepatocarcinoma in Wistar rats. **Communications orale et Poster présentées à la 7^{ème} Conférence internationale de l’Institut de l’Excellence à Yaoundé-Cameroun.**

Sipping K.M.T., Kenmogne V.L., Boudjeko T. (2018). Study of Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Ganoderma resinaceum* polysaccharides. **Communication orale et Poster présentées à la 5^{ème} Conférence internationale de l’Institut de l’Excellence Yaoundé-Cameroun.**

Sipping K.M.T., Kenmogne V.L., Nguena N.E.D., Kanemoto N.J.E., Mediesse K.F., Edou E.F., Boudjeko T. (2017). “Investigation of water-soluble polysaccharides from *Ganoderma resinaceum* for their antioxidant and anti-inflammatory effects”. Communication Poster présentée à la 24^{ème} conférence annuelle du comité Camerounais des Biosciences (CCB) à l’Université de Buea au Cameroun.

Research Article

Polysaccharide-Rich Fractions from *Ganoderma resinaceum* (Ganodermataceae) as Chemopreventive Agents in N-Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma in Wistar Rats

Marius Trésor Kemegne Sipping ^{1,2}, Francine Kengne Mediesse ^{1,3},
Larissa V. Kenmogne ^{1,4}, Judith Emery Ngomoyogoli Kanemoto ^{1,5},
Dieudonné Njamén ² and Thaddée Boudjeko ^{1,6}

¹Laboratory of Phytoprotection and Valorization of Genetic Resources, Biotechnology Centre, Nkolbisson, University of Yaoundé 1, P.O. Box 17673, Etetak, Yaoundé, Cameroon

²Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

³Centre for Research on Medicinal Plants and Traditional Medicine, Institute of Medical Research and Medicinal Plant Studies, P.O. Box 13033, Yaoundé, Cameroon

⁴Department of Surgery, Faculty of Health Sciences, University of Witwatersrand, Johannesburg 2193, South Africa

⁵Genomics Laboratory, Department of Biological Sciences, Birla Institute of Technology & Science, Pilani, Hyderabad Campus, Jawahar Nagar, Shamirpet Mandal, Hyderabad, India

⁶Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

Correspondence should be addressed to Thaddée Boudjeko; boudjeko@yahoo.com

Received 19 October 2021; Revised 2 March 2022; Accepted 21 March 2022; Published 12 April 2022

Academic Editor: Valeria Sülsen

Copyright © 2022 Marius Trésor Kemegne Sipping et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common and lethal diseases worldwide. Its treatment remains ineffective and the prognosis remains severe, thus favoring the emergence of a preventive approach. Mushroom-derived polysaccharides offer great opportunities because of their less toxicity and bioactivities. The present study aimed to investigate the chemopreventive effects of water-soluble polysaccharides from *Ganoderma resinaceum* on HCC. Two *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions (GRP I and GRP II) were obtained following hot water and alcohol precipitation. Their proteins, phenol compounds, and total neutral sugar content were assayed. The *in vitro* antiproliferative effect was assessed in MDA-MB 231, Hela, and HepG₂ using the MTT assay. Further, for the *in vivo* study, seven groups of nine rats each received N-diethylnitrosamine (100 mg/kg BW), vehicle (NaCl 0.9%), doxorubicin (10 mg/kg BW), or *G. resinaceum* polysaccharides (125 and 250 mg/kg BW). Liver cancer initiation and progression was assessed by evaluating histomorphology of liver section, hepatic injury markers, hematology, cytokines/chemokines levels, and stress oxidative markers. GRP II presented higher protein and sugar and lower phenol compound content than GRP I. GRP exhibited CC₅₀ of 340 and 261.7 in HepG₂ cells after 48 h. Moreover, GRP I and GRP II (125 and 250 mg/kg) prevented the alteration of the histoarchitecture of the liver induced by the DEN. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alpha-fetoprotein (AFP), proinflammatory cytokines (G-CSF, IFN γ , and TNF α), and chemokines (eotaxin and fractalkine) levels were significantly decreased in the GRP I- and GRP II-treated groups, while anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-12p70) levels were increased. The antioxidant defense was also stimulated by reducing malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO₂) levels, increasing catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, and reducing glutathione (GSH) levels. Our results indicate that GRP I exhibits chemopreventive effects by inhibiting cell proliferation and restoring liver architecture, antioxidant enzymes, and cytokines/chemokines balance.

1. Introduction

The prevalence of liver cancers is increasing in Asian and African populations due to their exposure to hepatitis B or C virus, the foremost causative agent of hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. HCC is one of the most frequent solid malignancies, accounts for 80–90% of liver cancers, and is the third common cause of cancer morbidity, resulting in almost one million deaths every year [2]. The survival rate after diagnosis of this disease is very low (~5%), as HCC is often diagnosed at a later stage [3]. Etiological factors of HCC include alcoholism, cirrhosis, hepatic steatosis, and some environmental chemicals. Nitrosamines, for instance, are an important class of environmental carcinogens owing to their carcinogenic and mutagenic properties [4].

Despite the plethora of conventional methods of treatment of HCC, such as chemotherapy, intervening therapy, and surgical resection, there is a lack of diagnostic tools leading to impoverishing their clinical benefits. Moreover, the drugs used in the treatment of HCC are associated with hepatotoxicity, and side effects have been observed with drugs such as 5-fluorouracil, cisplatin, and doxorubicin [5]. In fact, due to the highly vascular nature of the liver, HCC is prone to intrahepatic and extrahepatic metastases leading to treatment failure. Therefore, to manage hepatocellular carcinoma, there is an urgent need to develop less toxic and more efficient therapies targeting oxidative stress, inflammation, and tumor cells' proliferation [6–9]. Polysaccharide-rich fractions from natural plants and mushrooms due to their less toxicity and biological activities have recently attracted the attention of the scientific community. Many reports have highlighted anticancer activities of polysaccharide-rich fractions from mushroom species, namely, *Astragalus membranaceus*, *Salvia miltiorrhiza*, *Grifola frondosa*, *Angelica sinensis*, and Huaier fungus at the doses 60, 120, 180, and 240 mg/kg [10–13]. Moreover, intragastric administration of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLPS) at 100, 200, and 400 mg/kg for 09 consecutive days significantly decreases the tumor weight in a dose-dependent manner [14]. Many studies have reported hepatoprotective effects in HCC of some species belonging to the Ganodermataceae family due to their bioactive substances, including triterpenoids, sterols, steroids, peptides, and polysaccharides. It has been shown that *G. lucidum* polysaccharides (GLP) could inhibit tumor growth *in vitro* and *in vivo* either by directly blocking the cell cycle of hepatocarcinoma cells (HepG₂, BEL-7402, and Huh-7) or by indirectly regulating the immune system [15–17]. GLP could suppress HepG₂ cells via regulating hepatic miRNAs and immune-related miRNAs [18]. Yu et al. [19] have revealed that GLP could be a potent radiation sensitizer in HCC treatment. Otherwise, *G. resinaceum* has also proven its efficacy against liver injury induced by hepatotoxic agents. Peng et al. [20] have found that various terpenes from *G. resinaceum* had significant hepatoprotective activities due to their remarkable *in vitro* inhibitory activities against the increase of ALT and AST levels in HepG₂ cells induced by H₂O₂. The anticancer mechanisms involved include induction of tumor cell apoptosis, immunopotentialization

activity in combination with chemotherapy, and inhibition of tumor cell growth and metastasis [21].

Our previous studies have revealed that, at 125 mg/kg, GRP I and GRP II exhibited *in vivo* anti-inflammatory activities by limiting the infiltration of immune cells in the subcutaneous tissues, downregulating the production of proinflammatory cytokines (G-CSF, IFN γ , and TNF α) and chemokines (eotaxin and fractalkine), and upregulating the production of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-12p70) [22].

Nevertheless, so far, no studies have targeted the anticancer activity of the polysaccharide-rich fractions from *Ganoderma resinaceum* fruiting bodies. Therefore, the present work thus aimed to highlight the chemopreventive effects of *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions in the N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma model.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents. Chemical reagents for antioxidant assays were purchased from GIBCO (Grand Island, NY, USA). The N-diethylnitrosamine (CAS 55-18-5) was purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). Doxorubicin hydrochloride was supplied by Accord Healthcare France SAS (Lille, France). The rat alpha-fetoprotein (AFP) was obtained from Elabscience Biotechnology Inc. (USA). Trypan Blue (0.4%), [3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide], and cell culture media (RPMI and MEM) were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). All solutions and buffers were prepared in Ultrapure Milli-Q water. MDA-MB 231, Hela, and HepG₂ were obtained from the National Centre for Cell Science (NCCS) in Pune, India.

2.2. Collection and Pretreatment. *Ganoderma resinaceum* fruiting bodies were harvested in the locality of Mbalmayo (Centre Region of Cameroon) in May 2016. A sample was identified in comparison to the Voucher specimen DM 764 at the Laboratory of Mycology of the University of Yaoundé I, Cameroon. The mushrooms were then cut into small pieces, air-dried in the shade at room temperature, and powdered.

2.3. Isolation of Soluble Polysaccharides. *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions (GRP) were obtained as described by Hua et al. [23] with slight modifications. Briefly, the powder (650 g) was sieved and incubated in 6 L of 50% methanol at room temperature for 24 h. Then, the mixture was filtered using Whatman paper N° 10 and dried at 40°C for 2 h. The residue in distilled water 1 : 15 (w/v) was boiled at 80°C for 2 h and filtered with Whatman paper N° 10. The polysaccharides were precipitated by stepwise addition of ethanol to concentrations of 60 and 80%. After centrifugation (5000 g, 20 min), the pellet was resuspended in distilled water, dialyzed against distilled water (MWCO 14,000), and freeze-dried for further analysis. The

polysaccharide-rich fractions precipitated by 60 and 80% were termed GRP I and GRP II, respectively.

2.4. Phytochemical Analysis

Protein Content Assay. The quantity of proteins present in each polysaccharide-rich fraction was determined by the Bradford method using Bovine Serum Albumin (BSA) as standard [24]. Briefly, each polysaccharide-rich fraction (1 mL) was added to the same volume of Bradford reagent freshly prepared. After incubation in the darkness for 30 min, the absorbance of the mixture was measured at 595 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer.

Total Phenol Compounds Content Assay. The phenol compounds were quantified in the polysaccharide-rich fractions using the Folin–Ciocalteu (FC) reagent [25]. The FC reagent (75 μ L) was added to 750 μ L of polysaccharide-rich fractions (1 mg/mL). After 3 min incubation at room temperature, 750 μ L of Na₂CO₃ (20%) was added, and the mixture was incubated for 30 min in the darkness. The absorbance was read at 760 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. The amount of total phenols was estimated as expressed as ferulic acid equivalent/mg of dry weight (FAE/mg DW).

Determination of Total Sugar Content. The quantification of total sugars was performed using the phenol-H₂SO₄ colorimetric method with glucose as standard [26]. The total sugars were heated in an acid medium to release monosaccharides, which are transformed into dehydrated derivatives of furfural. In each tube containing 0.2 mL of polysaccharide-rich fractions, 0.2 mL of 5% phenol and 1 mL of concentrated sulfuric acid were added. The mixture was stirred and placed at 100°C for 10 min. Then, the mixture was cooled down,

and the absorbance was read at 485 nm. The amount of sugar was expressed as μ g equivalent glucose (EG)/mg of dry polysaccharide.

2.5. Cytotoxicity Assay

Cell Culture. MDA-MB 231, an ER-adenocarcinoma breast cell, HeLa, a cervical cancer cell, and HepG₂, a liver cancer cell, were obtained from the National Centre for Cell Science (Pune, India). MDA-MB 231 cells were cultured in Leibovitz (L-15) medium, while HepG₂ cells and HeLa cells were cultured in Minimum Essential Minimum Eagle (MEM) and Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), respectively. All cell cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (200 mM), streptomycin (200 μ g/mL), and penicillin (200 U/mL) and maintained at 37°C in 5% CO₂. The assay was carried out on cells with 85% confluence.

MTT Assay. About 10³ cells/100 μ L/well were plated in 96-well plates and incubated overnight in appropriate cells culture conditions. Then, they were treated with GRP I and GRP II diluted at various concentrations of 125–1000 μ g/mL with an appropriate cell culture medium for 48 hours in 5% CO₂ at 37°C. Thereafter, 20 μ L of MTT (5 mg/mL in PBS 1X) was added to each well, followed by an additional incubation of 4 hours. The supernatant was discarded, and formazan blue, which was formed in the cells, was dissolved with 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO). The plates were further incubated for 3 hours. The optical density was measured at 630 nm using a microplate ELISA reader (INNO-M, LTEK Corporation, South Korea).

The growth inhibition percentage was determined using the following formula:

$$\% \text{ of inhibition of cell proliferation} = 1 - \left[\left(\frac{\text{OD (630 nm) test}}{\text{OD (630 nm) control}} \right) \right] \times 100, \quad (1)$$

where OD control was the absorbance of the control and OD test was the absorbance in the presence of the sample.

2.6. In Vivo Experiment

Animal's Preparation. Healthy male Wistar rats aged 5 weeks and weighing 65–80 g were obtained from the breeding of the laboratory of Animal Physiology and Biology (University of Yaoundé 1). The rats were housed in polypropylene cages at room temperature, supplied with standard rat chow and water ad libitum, and kept at a natural light/dark cycle. The experiments were conducted in accordance with the principles and procedures of the European Union Animal Care (CEE Council 86/609) guidelines adopted by the Cameroon

Institutional National Ethics Committee, Ministry of Scientific Research and Innovation (Reg. number FWA-IRD 0001954).

Induction of Hepatocarcinoma. The rats were acclimatized for one week prior to being used. Then, they were randomly divided into 7 groups of 9 rats, each scheduled as the normal group and the negative control group, and received NaCl 0.9% only per os as a vehicle; the positive control group received doxorubicin as a reference drug at a dose of 10 mg/kg once a week *i.p.* and four test groups have received GRP I and GRP II at the doses of 125 and 250 mg/kg BW per day, respectively. The later dose of doxorubicin is equivalent to the human dose of 20 mg/m² according to Barnes and Paget [27]. Two weeks after this dietary regimen, all

groups except the normal group were administered with DEN (100 mg/kg BW, i.p.) dissolved in NaCl 0.9% once a week around 4:00 pm; phenobarbital (PB) 0.1% was introduced in drinking water as a promoter for 10 weeks. The normal group was also injected with an equal volume of vehicle for successive 10 weeks. The body weight and the behavioral changes of animals were recorded weekly. The promoter was withdrawn from drinking water for the last 3 days, and the animals that were dead or became moribund during the experiment were autopsied and sacrificed. After 12 weeks of experimentation, the remaining animals were sacrificed by cervical decapitation after 12 h of nonhydric fasting and valium (10 mg/kg BW) and ketamine anesthesia (50 mg/kg BW). The blood was collected in anticoagulant (EDTA) tubes for hematological study and in dried tubes (centrifuged at 600 g for 15 min at 4°C) for biochemical assays. Furthermore, liver was excised, washed in ice-cold saline, and blotted to dryness. A part of liver sections was fixed in a 10% neutral formalin solution for histomorphological analysis. Homogenate (1%) of liver tissue was prepared in Tris-HCl (0.1 M; pH 7.4) and centrifuged (600 g, 15 min), and the supernatant was used for biochemical assays. Organs such as brain, lungs, kidneys, spleen, and adrenergic glands were also removed and weighed.

Histomorphological Analysis. The pieces of liver were dehydrated in increased concentrations of ethanol solution and embedded in paraffin prior to sectioning 5–6 μm thickness with the rotating microtome (Leitz 1512, Marshall Scientific, Hampton, USA). The liver slices were stained with hematoxylin-eosin (HE), and histomorphological modifications were observed under Axioskop 40 microscope. Hepatocellular inflammatory infiltration and cell death were assessed.

Biochemical Analysis. The liver enzymes, aspartate (AST), and alanine (ALT) transaminases activities were determined using kits from Fortress Diagnostics Limited (Muckamore, United Kingdom). Alpha-fetoprotein (AFP) level was determined using ELISA kit (E-EL-R0153, Elabscience, Houston, USA) with respect to the manufacturer's instructions.

Multiplex Cytokines Assay. Serum samples from experimental rats were analyzed for cytokines and chemokines using the Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (EMD Millipore Corporation, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 25 μL of 1:2 diluted samples and standards (1:4 serial dilutions) was added in appropriate wells. Then, 25 μL of magnetic beads in solution was added, and the plate was washed twice with 1X wash buffer. The plate was incubated on an orbital shaker at 1000 rpm for 1 hr after adding 25 μL of detection antibodies; streptavidin-phycoerythrin (25 μL) was added, followed by an incubation of 30 min at RT. After washing, plate was resuspended in 125 μL of sheath fluid and read on the MAGPIX® instrument (Luminex, USA). Data obtained was analyzed using the Luminex xPONENT® multiplex assay software.

2.7. Stress Oxidative Markers' Assay

Malondialdehyde (MDA) Assay. MDA is one of the end products in the lipid peroxidation process. The lipid peroxides were estimated in the liver homogenates using the thiobarbituric acid (TBA) reactive substances tests [28]. Tissue homogenates (0.1 mL) and TBA (0.4 mL) were heated at 100°C for 15 min. After cooling rapidly, the mixture was centrifuged at 3000 g for 5 min, and the optical density of supernatant was read at 532 nm against an appropriate blank (without sample). The MDA content was determined using extinction molar coefficient ($0.153 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) and expressed as nmol MDA/g protein.

Catalase (CAT) Activity. Catalase activity was assessed by measuring the degradation of peroxide hydrogen (H_2O_2) following the method described by Sinha [29] with slight modifications. The mixture includes 0.2 mL of phosphate buffer (0.01 M, pH 7), 0.2 mL of tissue homogenate, and 0.2 mL of hydrogen peroxide. The reaction was stopped after 1 min by adding 1 mL of acetate dichromate, and the mixture was reacted at 100°C for 10 min. After cooling, absorbance was read at 620 nm, and the catalase activity was expressed as U/mg protein, with one unit of catalase activity equal to 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ degraded per minute.

Superoxide Dismutase (SOD) Assay. Superoxide dismutase activity was determined as described by McCord and Fridovich [30] with slight modifications based on the inhibition of adrenalin's autoxidation. The reaction mixture consisted of 0.2 mL of sample and 2.5 mL of carbonate buffer (0.05 M, pH 10.2). The reaction was initiated by adding 0.3 mL of adrenalin freshly prepared in buffer solution. The developed blue color was read at 480 nm at room temperature for 3 min. Units of SOD activity were expressed as the amount of enzyme required to inhibit autoxidation of adrenalin by 50%, and it was expressed as U/mg protein.

Glutathione Reduced (GSH) Assay. The levels of GSH in liver homogenates were estimated using the method illustrated by Ellman [31]. The tissue homogenate (in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4) is taken and added with 750 μL of Ellman's reagent (5 mg of dinitro-2,2'-dithio-5,5-dibenzoic in 250 mL of 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5). The test tubes were then shaken vigorously and incubated at room temperature for 1 h. Further, optical density was determined against a blank (without sample). The amounts of GSH content were determined using extinction molar coefficient ($13600 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) and expressed as $\mu\text{mol GSH/g}$ protein.

Nitric Oxide (NO) Content Assay. The amounts of NO in liver homogenates were determined using the method described by Marocci et al. [32]. In the test tubes, 500 μL of Griess reagent was added. The mixture was incubated in the darkness at room temperature for 10 min, and absorbance was read at 546 nm against a blank. Sodium nitrite at various concentrations (0.031, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, and 1 μM) was used as standard.

The concentrations of NO were determined using a standard curve and expressed as $\mu\text{mol/g}$.

2.8. Hematological Analysis. Hematological parameters (white blood cell (WBC) count, lymphocytes, monocytes, granulocytes, red blood cell (RBC) count, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular volume (MCV), and platelets) were also evaluated using Mindray BC 2800 Auto Hematology Analyzer form Shenzhen Mindray Bop-Medical Electronics Co., Ltd.

2.9. Statistical Analysis. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) for each experimental group. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 5.03 (San Diego, CA, USA) using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Phytochemical Content. In this study, two polysaccharide-rich fractions named GRP I and GRP II were obtained from *Ganoderma resinaceum* fruiting bodies using hot water extraction and alcohol precipitation. The partial characterization showed that GRP I and GRP II are mostly linked to proteins and total phenol compounds (Figure 1). Notably, GRP II presented higher protein content (11%) than GRP I (8%). However, the total phenol compounds were lower in GRP II (10%) than GRP I (15%), while total sugars were more abundant in GRP II (79%) than GRP I (77%).

3.2. Cytotoxicity Assessment. The cytotoxicity of *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions (GRP) on MDA-MB 231, Hela, and HepG₂ cancer cells is depicted in Table 1. GRP I and GRP II exhibited cytotoxicity after 48 h of incubation. However, GRP II presented the most significant inhibitory cytotoxic activity with CC₅₀ of 298, 341.1, and 298.7 on MDA-MB 231, Hela, and HepG₂, respectively.

3.3. Effects of GRP on Body Weight and Relative Organ Weights. All the treatments significantly affected the animal body weights throughout the experiment. However, doxorubicin-treated rats have presented lower weights ($P < 0.01$) as compared to the normal group (Figure 2). The treatments with GRP I and GRP II significantly decreased the relative weights of the organs after 12 weeks of treatment. DEN induction led to a significant increase of the relative weights of all organs removed, with the exception of adrenal glands and heart, in comparison to the normal group ($P < 0.01$). Animals treated with polysaccharide fractions GRP I 125 have also significantly reduced the relative weights of liver, kidneys, and spleen ($P < 0.001$) compared to the DEN group; meanwhile, GRP II 125 has

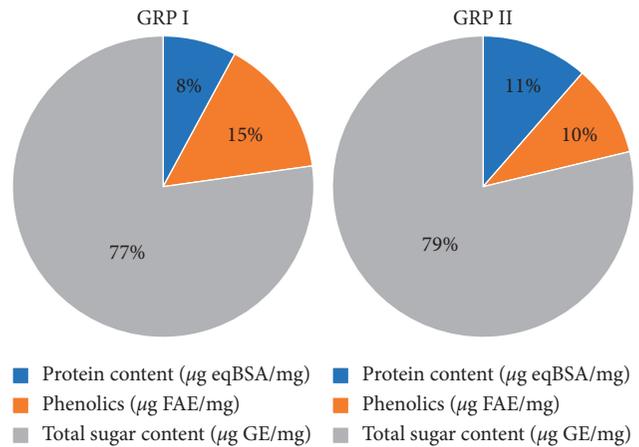


FIGURE 1: Phytochemical content of GRP I and GRP II.

TABLE 1: Cytotoxicity of *Ganoderma resinaceum* polysaccharide-rich fractions (GRP) in cancer cell lines.

	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
	GRP I	GRP II
MDA-MB 231	420.3	298.0
Hela	407.8	341.1
HepG ₂	340.0	261.7

CC₅₀: concentration of *G. resinaceum* polysaccharide fractions leading to 50% of cell viability. Hela, MDA-MB 231, and HepG₂ were incubated for 48 h with increasing concentrations (125–1000 $\mu\text{g/mL}$) of GRP, and the cell viability was evaluated by MTT assay. The results are expressed in percentage as the mean \pm SD.

presented the highest percentage of reduction. The same observations were done in doxorubicin-treated animals. No significant change was found between DEN and the other treated groups (Table 2).

3.4. Histopathological Data. Liver tissue presented hepatic cells with granulated cytoplasm, portal vein, hepatic artery, small uniform nuclei, and nucleolus. So, no normal architecture of liver tissues was observed in the normal group (Figure 3(a)). DEN-treated rats presented a massive infiltration of inflammatory cells: Kupffer cells and leukocytes (Figure 3(b)). Architecture of liver tissue sections of doxorubicin-treated rats was improved in comparison to the negative control rats. Nevertheless, a weak infiltration of inflammatory cells was observed (Figure 3(c)). Significant restoration of architecture was observed in liver tissue of the GRP-treated groups as compared to the negative control group characterized by an absence of inflammatory cells in portal veins and normal appearance of liver cells (Figures 3(d)–3(g)).

Histopathological findings were confirmed by the number of portal veins presenting infiltration of immune cells. The normal group has presented any leukocyte infiltration. Meanwhile, the negative control group has shown 04 portal veins with immune cells infiltration. On the other hand, positive control has presented the lowest numbers of portal veins with infiltration of immune cells

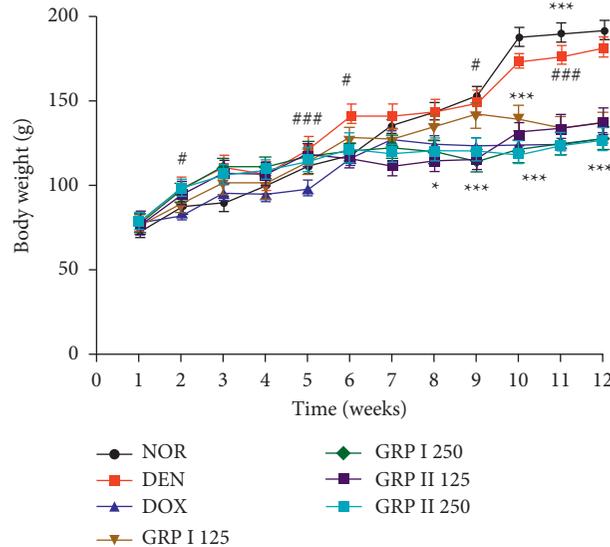


FIGURE 2: Effects of GRP on body weight of different experimental groups of rats after 12 weeks. NOR = normal control (animals received only saline solution 0.9%); DEN = negative control (animals received N-diethylnitrosamine + saline 0.9%); DOX + DEN = positive control (animals received doxorubicin + N-diethylnitrosamine); GRP I + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP I + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg; GRP II + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP II + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg. Values represent means \pm SD ($n = 9$). All experimental animals except the normal group (NOR) were exposed to a daily dose of N-diethylnitrosamine (100 mg/kg) for 10 weeks. ### $P < 0.001$ and ## $P < 0.01$ compared to the normal group; # $P < 0.05$ compared to the normal group; * $P < 0.05$ compared to the negative control; ** $P < 0.01$ compared to the negative control; *** $P < 0.001$ compared to the negative control.

TABLE 2: Relative weight of wet organs (g/100 g PC) in different experimental groups after 12 weeks.

Organs (mg/kg)	NOR	DEN	DOX + DEN	GRP I + DEN (mg/kg)		GRP II + DEN (mg/kg)	
				125	250	125	250
Liver	327.4 \pm 40.3	433.9 \pm 17.5###	325.5 \pm 35.3***	335.6 \pm 32.2***	414.7 \pm 42.3	394.9 \pm 14.9	446.0 \pm 16.7
Kidneys	59.7 \pm 3.2	86.8 \pm 5.8###	73.3 \pm 3.1***	75.4 \pm 3.4***	75.8 \pm 3.4**	73.7 \pm 4.8**	82.5 \pm 4.7
Adrenal glands	2.4 \pm 0.5	2.5 \pm 0.2	3.7 \pm 0.6	3.2 \pm 0.4	3.6 \pm 0.8	3.4 \pm 1.2	4.82 \pm 0.2***
Heart	37.2 \pm 3.9	38.7 \pm 3.7	40.7 \pm 4.7	39.1 \pm 4.3	40.1 \pm 1.4	37.0 \pm 4.5	41.6 \pm 2.5
Lungs	68.6 \pm 0.6	142.8 \pm 4.5###	136.3 \pm 1.7**	91.3 \pm 4.7***	103.4 \pm 0.3***	97.7 \pm 2.7***	123.7 \pm 3.2***
Spleen	36.6 \pm 2.3	55.2 \pm 1.5###	41.6 \pm 2.3***	48.8 \pm 1.1	62.5 \pm 4.8**	74.4 \pm 4.0***	70.4 \pm 4.1***
Brain	96.0 \pm 2.7	126.5 \pm 3.8###	125.4 \pm 3.0	104.8 \pm 7.0***	98.7 \pm 5.0***	109.5 \pm 0.8***	138.0 \pm 6.9**
Testicles	131.3 \pm 8.7	94.1 \pm 0.6###	123.0 \pm 5.4***	132.0 \pm 1.6***	158.4 \pm 1.4***	101.4 \pm 2.6*	81.8 \pm 2.7***
Seminal vesicles	55.8 \pm 4.6	31.0 \pm 1.3###	7.4 \pm 0.7***	10.3 \pm 1.0***	38.8 \pm 0.7***	17.2 \pm 1.2***	5.1 \pm 0.3***
Epididymis	49.5 \pm 3.3	32.0 \pm 2.3###	32.5 \pm 3.1	36.7 \pm 4.3	21.6 \pm 0.4***	30.2 \pm 1.9	20.1 \pm 3.1***
Femur	37.6 \pm 2.1	29.9 \pm 1.5###	39.2 \pm 3.5***	43.2 \pm 0.6***	30.2 \pm 0.7	31.0 \pm 1.6	52.2 \pm 2.7***

NOR = normal control (animals received only saline solution 0.9%); DEN = negative control (animals received N-diethylnitrosamine + saline 0.9%); DOX + DEN = positive control (animals received doxorubicin + N-diethylnitrosamine); GRP I + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP I + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg; GRP II + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP II + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg. Values represent means \pm SD ($n = 9$). All experimental animals except the normal group (NOR) were exposed to a daily dose of N-diethylnitrosamine (100 mg/kg) for 10 weeks. ### $P < 0.001$ and ## $P < 0.01$ compared to the normal group; # $P < 0.05$ compared to the normal group; * $P < 0.05$ compared to the negative control; ** $P < 0.01$ compared to the negative control; *** $P < 0.001$ compared to the negative control.

(0.67). GRP treated groups at 125 and 250 mg/kg have shown slightly infiltration of immune cells in portal veins. (Figure 4).

3.5. Effects of GRP on Some Biochemical Markers of Hepatocellular Carcinoma. Exposition to DEN led to significantly ($P < 0.001$) increased ALT and AST activities by 36 and 19%, respectively, as compared to the normal groups. Significant ($P < 0.001$) decreases have been noticed in the

doxorubicin group and the GRP I- and GRP II-treated groups as compared to the negative control rat (Figures 5(a) and 5(b)). According to AFP, there was a significant increase in HCC rats treated with DEN in comparison to the normal group ($P < 0.001$). Doxorubicin administration significantly reduced AFP levels by 1.9-fold as compared to the negative control ($P < 0.001$). GRP I and GRP II have also reduced AFP levels at 125 and 250 mg/kg (by 2.2, 1.3, 2.1, and 1.5-fold), respectively, compared to the negative control (Figure 5(c)).

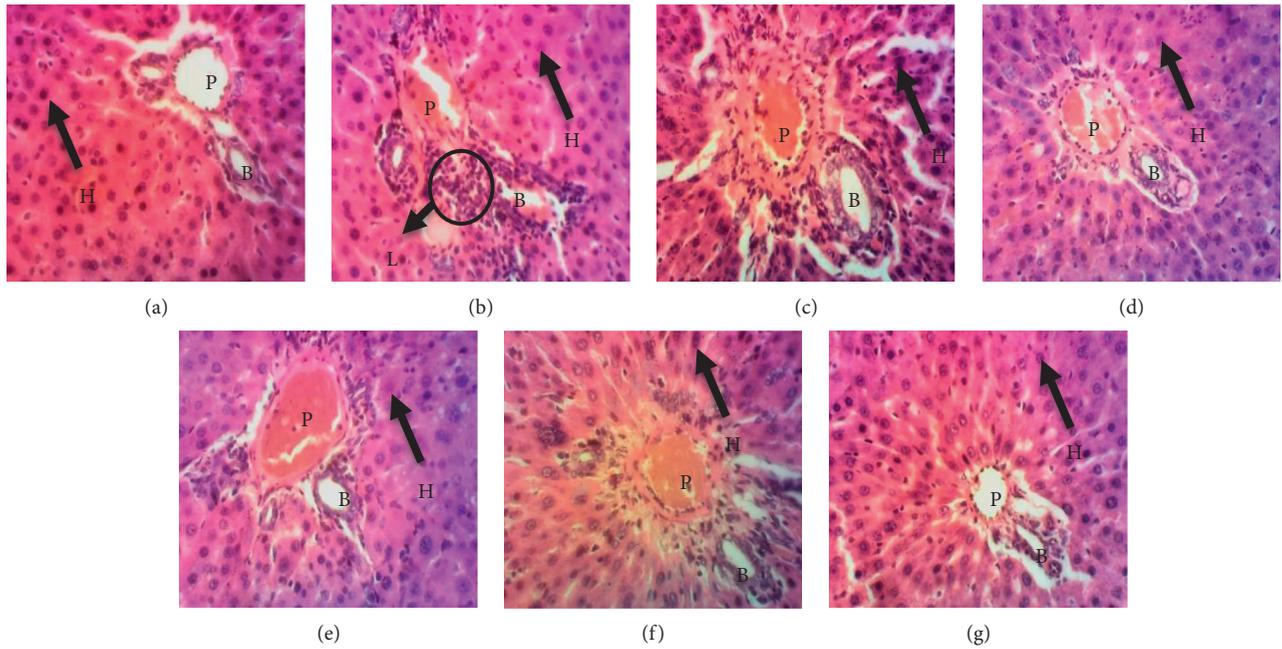


FIGURE 3: Photomicrographs of liver tissue sections of the experimental groups (X200, HE). (a) The normal group shows an intact cell membrane and normal hepatocytes. (b) Massive infiltration of inflammatory cells (Kupffer cells; leukocyte). (c) Positive control shows a significant restoration of the normal architecture of the liver tissue section with a weak infiltration of inflammatory cells. (d) Animals received polysaccharide fraction GRP I + N-diethylnitrosamine at 125 mg/kg. (e) Animals received polysaccharide fraction GRP I + N-diethylnitrosamine at 250 mg/kg. (f) Animals received polysaccharide fraction GRP II + N-diethylnitrosamine at 125 mg/kg. (g) Animals received polysaccharide fraction GRP II + N-diethylnitrosamine at 250 mg/kg. In the GRP-treated groups (D-G), there was a significant restoration of the normal architecture of liver tissue with radially arranged hepatocytes similar to normal control. He = hepatocyte, Bc = biliary canaliculus, Pv = portal vein, and Li = leukocyte inflammation.

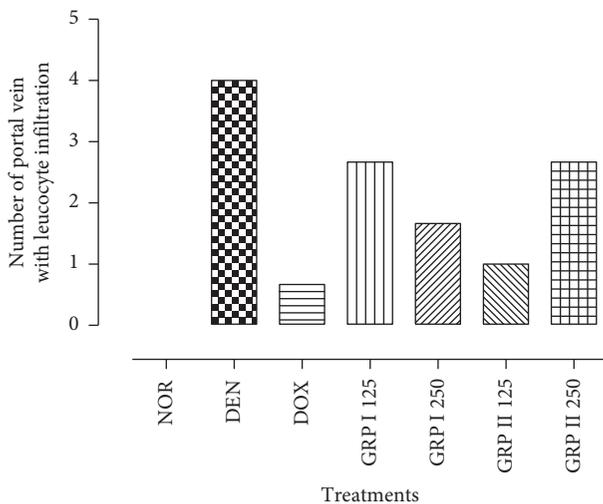


FIGURE 4: Number of portal veins with infiltration of immune cells in the experimental groups.

3.6. Effects of GRP on Cytokines and Chemokines Production. In general, DEN has caused an overproduction of proinflammatory cytokines: G-CSF, IFN γ , TNF α ($P < 0.001$), eotaxin ($P < 0.01$), and fractalkine ($P < 0.05$) compared to the normal groups. However, GRP leads to a significant decrease in proinflammatory cytokines and chemokines as positive control (DOX). The more significant effects were observed in the GRP I 125-treated group with

30000 ± 5773.50 , 2500 ± 182.57 , and 5247.79 ± 549.85 for G-CSF, IFN γ , and TNF α , respectively (Figures 6(a)–6(c)). GRP I 125 also has the highest effects on eotaxin and fractalkine levels with 28449.86 ± 4523.66 and 1686.22 ± 62.64 pg/mL (Figures 6(f) and 6(g)). On the other hand, the levels of antitumor cytokines (IL-10 and IL-12p70) were significantly ($P < 0.001$) decreased in the GRP-treated group compared to the negative control (DEN). The highest values were obtained in GRP I 250 for IL-10 and in GRP I 125 with 2524.49 ± 312.67 and 31480.93 ± 57.84 pg/mL, respectively (Figures 6(d) and 6(e)).

3.7. Oxidative Stress Markers. The effects of *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions on oxidative stress markers are illustrated in Figure 7. DEN induced a significant ($P < 0.001$) increase in malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO $_2$) levels by 6.6- and 2.0-fold, respectively, as compared to the normal control (Figures 7(a) and 7(e)). Moreover, DEN depleted significantly ($P < 0.001$) catalase and superoxide dismutase (SOD) activities and reduced glutathione (GSH) levels by 54.7, 54.5, and 47.8%, respectively, compared to the normal control, while doxorubicin and GRP improved the antioxidant parameters of experimental rats (Figures 7(b)–7(d)). Doxorubicin, GRP I, and GRP II at all doses significantly ($P < 0.001$) reduced the MDA levels when compared to the negative control (Figure 7(a)). Catalase activity significantly increased ($P < 0.001$) by 3.2-fold (DOX and GRP I

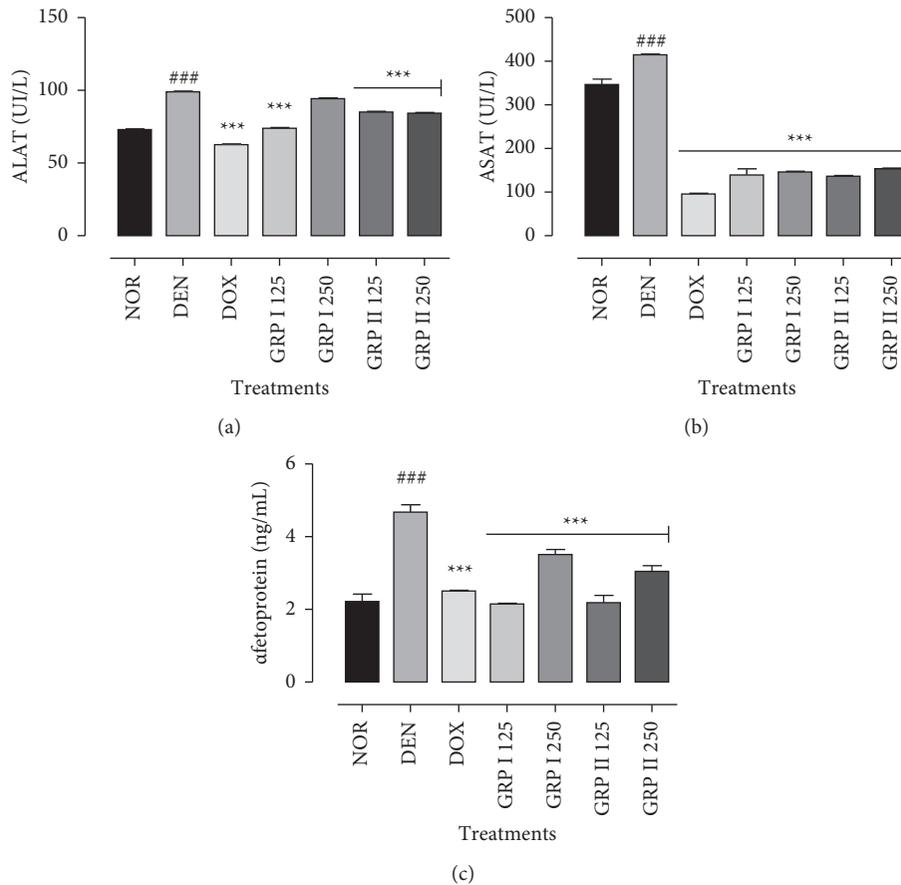


FIGURE 5: Effects of GRP on ALAT (a), ASAT (b), and AFP (c) levels. NOR = normal control (animals received only saline solution 0.9%); DEN = negative control (animals received N-diethylnitrosamine + saline 0.9%); DOX + DEN = positive control (animals received doxorubicin + N-diethylnitrosamine); GRP I + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP I + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg; GRP II + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP II + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg. Values represent means \pm SD ($n=9$). All experimental animals except the normal group (NOR) were exposed to a daily dose of N-diethylnitrosamine (100 mg/kg) for 10 weeks. ### $P < 0.001$ and ** $P < 0.01$ compared to the normal group; # $P < 0.05$ compared to the normal group; * $P < 0.05$ compared to the negative control; ** $P < 0.01$ compared to the negative control; *** $P < 0.001$ compared to the negative control.

125) and 2.5-fold for the GRP I 250-, GRP II 125-, and GRP II 250-treated groups, respectively, with respect to the negative control groups (Figure 7(b)). SOD activity was increased significantly ($P < 0.001$) in the doxorubicin-, GRP I 125-, and GRP II 250-treated groups by 1.8-, 1.7-, and 1.5-fold, respectively (Figure 7(c)). GRP I 125 and GRP II 125 increased significantly ($P < 0.05$) GSH levels by 1.5- and 1.3-fold ($P < 0.001$) more than the DOX-treated group by 1.2-fold (Figure 7(d)). NO_2 levels were significantly lowered ($P < 0.001$) by the doxorubicin- and GRP-treated groups (Figure 7(e)).

3.8. Hematological Analysis. As shown in Table 3, the rats treated with DEN significantly decreased WBCs, monocytes ($P < 0.001$), lymphocytes, granulocytes ($P < 0.01$) counts, and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ($P < 0.05$) in comparison to the normal control group. Animals treated with GRP I at 125 and 250 mg/kg have shown a significant increase in WBCs, lymphocytes ($P < 0.05$) count, and hematocrit ($P < 0.001$) as compared to

the negative control group. Furthermore, a significant decrease in monocytes ($P < 0.001$), MCV ($P < 0.001$), granulocytes ($P < 0.05$), and ($P < 0.001$) was observed for 125 and 250 mg/kg, respectively. There was a significant increase in WBCs ($P < 0.01$) and granulocytes counts in GRP II 125 ($P < 0.01$) and GRP II 250 ($P < 0.05$) as compared to the negative control group. Monocytes significantly decreased in the GRP II 125 ($P < 0.01$) and GRP II 250 groups ($P < 0.05$) with respect to the negative control group.

4. Discussion

The liver, due to its many functions including the metabolism of carbohydrates, fats, and proteins; biosynthesis of urea and cholesterol; storage of vitamins and minerals; and regulation of glycaemia and removal of xenobiotics from blood (such as alcohol, drugs), is the privileged target of chemical toxicants [33, 34]. Diethylnitrosamine-phenobarbital (DEN/PB) is a suitable experimental model in liver carcinogenesis and chemoprevention, thanks to its well-known metabolic pathway and carcinogenicity [35]. PB is

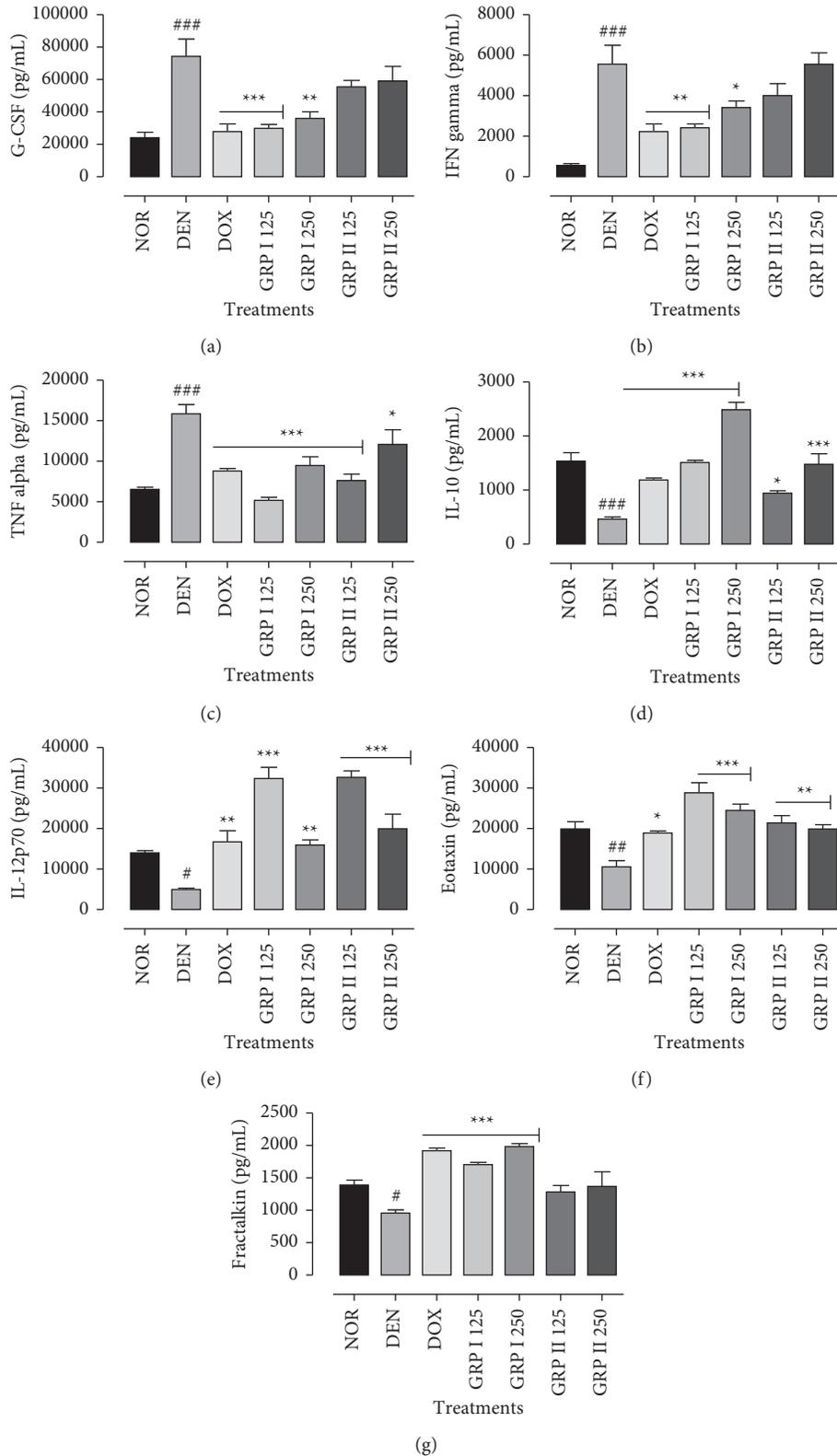


FIGURE 6: Effects of GRP on serum cytokines and chemokines levels. NOR = normal control (animals received only saline solution 0.9%); DEN = negative control (animals received N-diethylnitrosamine + saline 0.9%); DOX + DEN = positive control (animals received doxorubicin + N-diethylnitrosamine); GRP I + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP I + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg; GRP II + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP II + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg. The following cytokines, namely, (a) G-CSF, (b) IFN γ , (c) TNF α , (d) IL-10, (e) IL-12 p70, (f) eotaxin, and (g) fractalkine, were analyzed. One-way ANOVA and Bonferroni test were used to compute statistics between groups, respectively. Values represent means \pm SD ($n = 9$). All experimental animals except the normal group (NOR) were exposed to a daily dose of N-diethylnitrosamine (100 mg/kg) for 10 weeks. ### $P < 0.001$ and ## $P < 0.01$ compared to the normal group; * $P < 0.05$ compared to the normal group; * $P < 0.05$ compared to the negative control; ** $P < 0.01$ compared to the negative control; *** $P < 0.001$ compared to the negative control.

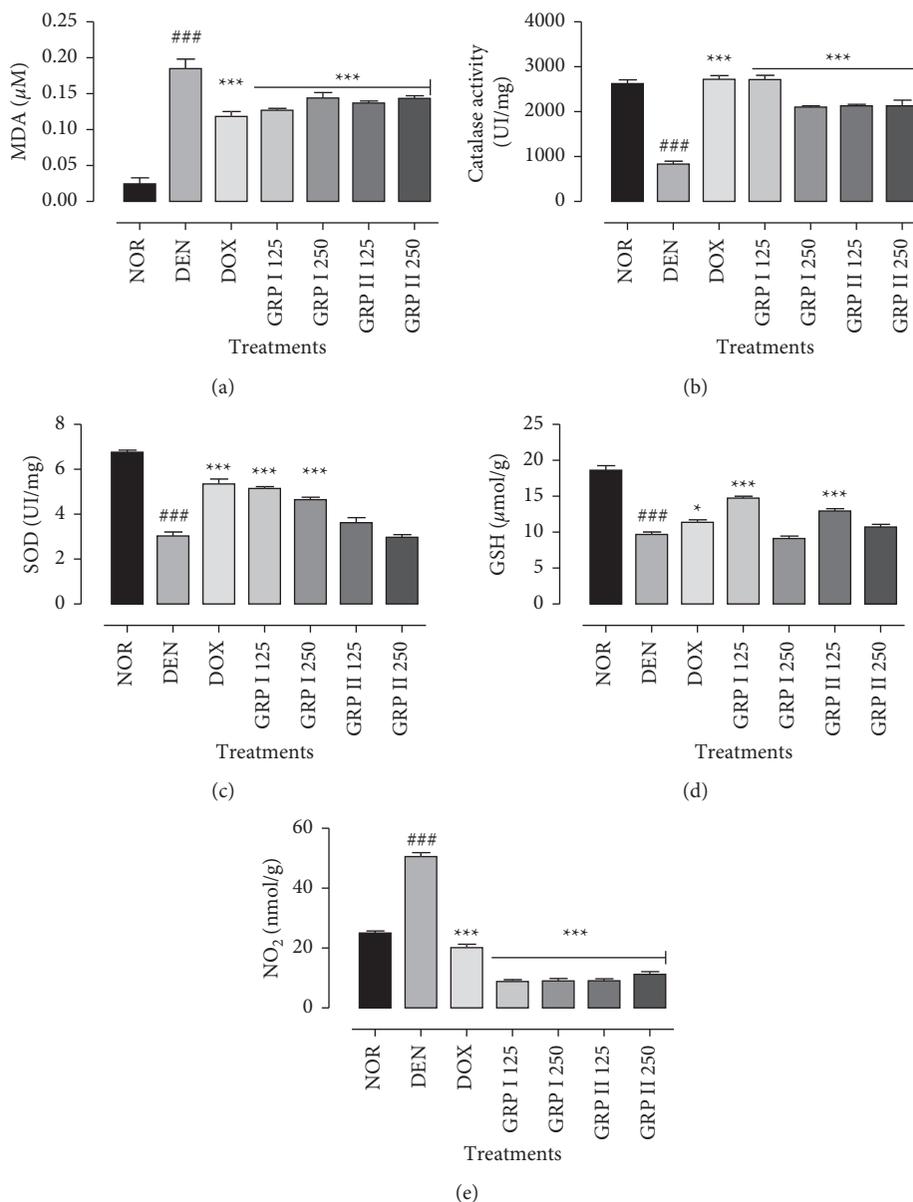


FIGURE 7: Effects of *G. resinaceum* polysaccharides on enzymatic and nonenzymatic parameters. (a) MDA levels. (b) Catalase activity. (c) SOD activity. (d) GSH levels. (e) NO_2 production. NOR = normal control (animals received only saline solution 0.9%); DEN = negative control (animals received N-diethylnitrosamine + saline 0.9%); DOX + DEN = positive control (animals received doxorubicin + N-diethylnitrosamine); GRP I + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP I + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg; GRP II + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP II + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg. Values represent means \pm SD ($n=9$). All experimental animals except the normal group (NOR) were exposed to a daily dose of N-diethylnitrosamine (100 mg/kg) for 10 weeks. $^{###}P < 0.001$ and $^{##}P < 0.01$ compared to the normal group; $^{\#}P < 0.05$ compared to the normal group; $^*P < 0.05$ compared to the negative control; $^{**}P < 0.01$ compared to the negative control; $^{***}P < 0.001$ compared to the negative control.

generally used as a promoter of HCC due to its hepatotoxicity through metabolic activation and enhancement of hepatic enzymes, including cytochrome P450s, glucuronosyltransferases, and glutathione S-transferases. In fact, activation of nitrosamines by cytochrome P450 enzymes leads to adducts with DNA and cell proteins and has a high activity on centrilobular hepatocytes [36, 37].

Partial characterization of GRP I and GRP II revealed the presence of phenolics and proteins suggesting glycoproteins structure in mycetes matrix [38, 39].

Cytotoxicity is an appropriate prerequisite in the study of biological properties of pure biocompounds or mixtures. In fact, cytotoxicity appears as a useful tool to indicate the antiproliferative or lethal effects of a substance [40]. *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions exhibited weak cytotoxic effects against MDA-MB 231, HeLa, and HepG₂ with CC₅₀ range of 298–420 $\mu\text{g/mL}$ after 48 h of incubation. Polysaccharides are generally known for their *in vitro* anticancer activities either by regulating cell cycle, intracellular Ca^{2+} concentration triggering apoptosis, immunopotential,

TABLE 3: Effects of *G. resinaceum* polysaccharide fractions on hematological parameters after 12 weeks of treatment.

Parameters	NOR	DEN	DOX	GRP I + DEN (mg/kg)		GRP II + DEN (mg/kg)	
				125	250	125	250
WBC ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	11.30 \pm 0.55	5.45 \pm 0.21#	16.23 \pm 0.09****	11.60 \pm 0.51*	12.80 \pm 0.10*	14.60 \pm 0.16**	15.80 \pm 0.85***
Lymphocytes (%)	77.06 \pm 3.43	62.6 \pm 3.82##	70.45 \pm 3.71**	59.70 \pm 2.49	73.30 \pm 0.96*	65.53 \pm 3.60	58.45 \pm 2.05
Monocytes (%)	10.12 \pm 1.89	19.05 \pm 1.62###	11.33 \pm 0.60****	11.20 \pm 0.74****	11.40 \pm 0.49****	11.70 \pm 0.65****	11.65 \pm 1.91*
Granulocytes (%)	14.17 \pm 0.48	21.75 \pm 1.48###	18.25 \pm 1.43	23.77 \pm 3.18*	15.40 \pm 0.53****	22.10 \pm 0.86**	29.90 \pm 0.14****
RBC ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	5.98 \pm 0.35	4.95 \pm 0.15	4.66 \pm 0.42	6.29 \pm 0.28	6.76 \pm 0.18	5.33 \pm 0.27	5.61 \pm 0.68
Hematocrit (%)	40.22 \pm 0.55	33.20 \pm 1.70	34.07 \pm 1.93	41.55 \pm 0.52*	47.80 \pm 1.50****	38.47 \pm 0.58	39.20 \pm 1.55
MCV (fL)	67.24 \pm 1.36	72.00 \pm 1.84#	71.87 \pm 0.48	67.70 \pm 1.17	70.70 \pm 1.78	73.40 \pm 0.86	69.65 \pm 1.91
MPV (fL)	7.04 \pm 0.66	8.60 \pm 1.41#	9.43 \pm 0.57	6.17 \pm 0.74****	6.40 \pm 0.36****	8.63 \pm 0.05	8.70 \pm 0.71
Platelets ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	584.20 \pm 56.15	590.00 \pm 22.63	631.50 \pm 65.73	659.00 \pm 41.72	614.00 \pm 77.48	426.00 \pm 36.74	543.00 \pm 42.43
Hemoglobin (g/dL)	11.84 \pm 1.11	10.95 \pm 0.07	10.00 \pm 0.08	11.97 \pm 0.17	14.30 \pm 0.27	10.97 \pm 0.05	10.60 \pm 0.42
MCHC (g/dL)	29.40 \pm 1.78	28.25 \pm 0.21	24.97 \pm 0.61*	28.85 \pm 1.50	30.00 \pm 2.33	26.73 \pm 1.17	27.05 \pm 0.64

NOR = normal control (animals received only saline solution 0.9%); DEN = negative control (animals received N-diethylnitrosamine + saline 0.9%); DOX + DEN = positive control (animals received doxorubicin + N-diethylnitrosamine); GRP I + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP I + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg; GRP II + DEN = animals received polysaccharide fraction GRP II + N-diethylnitrosamine at doses 125 and 250 mg/kg. Values represent means \pm SD (n = 9). All experimental animals except the normal group (NOR) were exposed to a daily dose of N-diethylnitrosamine (100 mg/kg) for 10 weeks. ### $P < 0.001$ and ## $P < 0.01$ compared to the normal group; # $P < 0.05$ compared to the normal group; * $P < 0.05$ compared to the negative control; ** $P < 0.01$ compared to the negative control; *** $P < 0.001$ compared to the negative control.

or miR-125b inhibiting T_{regs} accumulation and function [41–46]. These properties might be associated with the specific conformation of polysaccharides and their affinity for cancer cell surface [47]. However, considering the aforementioned arguments and the traditional uses of *G. resinaceum* to manage various ailments, we sought to determine the *in vivo* antitumor activities of *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions.

Histopathological findings in liver specimens are in line with biochemical results. Microscopic analysis of the DEN-treated groups has shown a massive infiltration of inflammatory cells in the portal vein reflecting the initiation of hepatocellular carcinoma. These observations overcame such evidence on DEN/PB carcinogenicity [48, 49]. Liver specimens from GRP-treated rats after DEN administration showed quasinormal microarchitecture with no necrosis, few scattered foci of inflammation in hepatocyte lobule, and nondilated portal veins. Similar observations have been reported on the protective effect of polysaccharides and other natural plants and mushrooms such as *Lycium chinensis*, *Astragalus membranaceus*, *Antrodia cinnamomea*, *Lycium barbarum*, and *Mangifera indica* on chemically liver injury [50–54].

Hepatic biomarkers such as transaminases (ALT and AST) and alpha-fetoprotein levels offer insights into liver functions [55]. The abnormal increases of ALT and AST levels in sera imply resultant liver injury induced by DEN. This compound breaks down cell membrane architecture (leading to spillage of these enzymes into serum) which in turn could induce overproduction of these enzymes [56–59]. AFP is a glycoprotein synthesized during early fetal life; its level falls quickly after birth. Elevation of serum alpha-fetoprotein levels is usually characteristic of advanced HCC in adults [60]. This can be explained by its strong implication as a transport molecule for many ligand heavy metals, bilirubin, and many xenobiotics. Moreover, AFP intervenes in the regulation of cell proliferation and immunosuppression [61, 62]. In the current investigation, we have found that later, doxorubicin can also enhance AFP levels. In fact, doxorubicin can cause an idiosyncratic reaction and potentially contribute to liver toxicity by delaying excretion, increasing accumulation of the drug in plasma and tissues, leading to systemic side effects like cardiomyopathy [63]. In contrast, *G. resinaceum* polysaccharides decrease ALT, AST, and AFP levels leading to maintaining the integrity of plasma membrane and suppressing the leakage of enzymes through membranes. These results reflect the ability of GRP to lessen hepatocellular carcinoma initiation and promotion.

Cytokines are low molecular weight polypeptide mediators of cellular communication that are produced and released by different cell types in the liver. They play a key role in the initiation, maintenance, and progression of tumors. The development of tumors is promoted by cytokines G-CSF, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-10, and IL-12p70 released by neoplastic cells and tumor-associated macrophages (TAM) [61]. Moreover, chemokines such as eotaxin and fractalkine are a superfamily of proinflammatory molecules providing signals for tracking, adhesion, and migration of leukocytes at sites of injury and inflammation [64]. In this study, administration of DEN induced overproduction of

proinflammatory cytokines (G-CSF, $IFN\gamma$, and $TNF\alpha$) and chemokines such as eotaxin and fractalkine, while GRP I alleviated significantly these inflammatory cytokine levels. The levels of IL-10 and IL-12p70 were significantly increased in the GRP-treated groups. Polysaccharides are reported as potent antitumor agents due to their immunoregulatory activities [65, 66]. Chemokines such as fractalkine are key elements in the progression of HCC. The expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 is upregulated in hepatocytes during liver injury. The antitumor activities of fractalkine have been reported in several *in vivo* studies using normal mice [67]. Eotaxins are potent chemoattractant cytokines generally involved in allergic diseases. They have also revealed their implications in regulation of other immune cells in tumor microenvironment or direct cytotoxic functions against cancers cells. Studies have shown that TATE (tumor-associated tissue eosinophilia) or degranulation of eosinophilia is connected with an improved prognosis of some types of tumors such as colorectal cancer, esophageal, bladder, or prostate cancer [68].

Furthermore, antioxidant properties of *G. resinaceum* polysaccharides were examined to better understand their hepatoprotective effects. Hepatocellular carcinoma can be triggered by DEN through the overproduction of free radicals reacting with proteins, lipids, and nucleic acids. Biotransformation of DEN by cytochrome P450 produces promutagenic adducts O^6 -ethyl-deoxyguanosine and O^4 - and O^6 -ethyl deoxythymidine that bind to DNA, destabilizing gene sequences. Consequently, these electrophilic compounds overwhelm antioxidant defenses proceeding to oxidative stress and initiating liver carcinogenesis [69–71]. As antioxidant enzymes, SOD converts superoxide radicals to hydrogen peroxide. Hereafter, catalase catalyzes the dismutation of hydrogen peroxide to water and oxygen [72].

DEN treatment led to significant decreases in antioxidant enzymes (SOD and CAT) and GSH and increases in lipid peroxidation. The results are consistent with those reported by Hebatallah et al. [73], whereas these effects are attenuated in GRP-treated rats confirming their hepatoprotective properties by either free radicals scavenging or antioxidant activities. High production of NO and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression is noticed in DEN-induced HCC. The main roles of NO include vasodilatation, inhibition of platelet, cell-to-cell communication, and cytotoxicity beneficial for improving necrosis in liver cells. Overproduction of NO by iNOS-mediated hepatotoxicity is more often indirect by activation of inflammatory cells [74]. The elevated level of NO was reduced by GRP treatment, suggesting that their hepatoprotective effects may be related to the inhibition of NO release. These findings are in agreement with other reports on polysaccharides inhibiting DEN-induced oxidative stress [75].

Hematological parameters and markers play a key role in the systemic inflammatory response and have been correlated to several malignancies. Then, they are very sensitive to detecting the deleterious effects of substances on our health. So, it is primordial to study the variations of hematological parameters in liver cancer patients at regular intervals during treatment [76, 77]. Our data revealed that DEN

induced pancytopenia characterized by a statistical decrease in white blood cells (WBCs), lymphocytes, monocytes, granulocytes counts, and mean corpuscular volume (MCV) compared to the normal group. The low concentrations of RBCs and hemoglobin are most common in primary HCC patients: this is called normochromic normocytic anemia [78]. Moreover, leucopenia and thrombocytopenia observed in this study are present in patients with splenomegaly and with a history of bleeding tendencies. The abnormalities of hematological parameters in chronic liver diseases are cross-linked to the damage of bone marrow, and plasma membranes contain high levels of prooxidant products [79, 80]. In opposite, *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions increased WBCs, lymphocytes count, and hematocrit, meaning that they could mitigate or attenuate the harmful effects of anemia and leukocytosis against DEN intoxication.

5. Conclusions

Taking together, the present findings support that *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions exhibited chemopreventive effects correlated probably to their phytochemical content and molecular weights. GRP exerted cytotoxic activities against MDA-MB 231, HeLa, and HepG₂. GRP also endowed the capacity to initiate the immune response by regulating inflammatory cytokines and chemokines. Biochemical, histopathological, and hematological data in rats indicated that the alleviated effects of GRP are due to its antioxidant and anti-inflammatory properties. The most relevant activities were obtained in the GRP I- and GRP II-treated groups at 125 mg/kg. This study provides insights for using GRP I as a potential chemopreventive agent in hepatocellular carcinoma.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] J. M. Llovet, J. Zucman-Rossi, and E. Pikarsky, "Hepatocellular carcinoma," *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 2, Article ID 16018, 2016.
- [2] X. Zhao, K. Jiang, B. Liang, and X. Huang, "Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF- κ B/p53-apoptosis signaling pathway," *Oncology Reports*, vol. 35, no. 2, pp. 669–675, 2016.
- [3] J. M. Llovet, A. Burroughs, and J. Bruix, "Hepatocellular carcinoma," *The Lancet*, vol. 362, no. 9399, pp. 1907–1917, 2003.
- [4] A. Ciemniak, "A comparison of N-nitrosodimethylamine contents in selected meat products," *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, vol. 57, pp. 341–346, 2006.
- [5] Y. Zhou, Y. Li, and T. Zhou, "Dietary natural products for prevention and treatment of liver cancer," *Nutrients*, vol. 8, no. 156, pp. 1–23.
- [6] M. B. Thomas, D. Jaffe, M. M. Choti et al., "Hepatocellular carcinoma: consensus recommendations of the national cancer Institute clinical trials planning meeting," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 25, pp. 3994–4005, 2010.
- [7] T. R. Morgan, "Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C," *Recent Results in Cancer Research*, vol. 188, pp. 85–99, 2011.
- [8] A. Bishayee, "Editorial [hot topic: recent advances in the prevention and therapy of hepatocellular carcinoma]," *Current Cancer Drug Targets*, vol. 12, no. 9, pp. 1043–1044, 2012.
- [9] S. Singh, P. P. Singh, L. R. Roberts, and W. Sanchez, "Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma," *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 11, no. 1, pp. 45–54, 2014.
- [10] C. Li, X. Wu, H. Zhang et al., "A Huaier polysaccharide restrains hepatocellular carcinoma growth and metastasis by suppression angiogenesis," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 75, pp. 115–120, 2015.
- [11] Q. Yu, S.-P. Nie, J.-Q. Wang, D.-F. Huang, W.-J. Li, and M.-Y. Xie, "Toll-like receptor 4 mediates the antitumor host response induced by Ganoderma atrum polysaccharide," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, no. 2, pp. 517–525, 2015.
- [12] G.-H. Mao, Y. Ren, Q. Li et al., "Anti-tumor and immunomodulatory activity of selenium (Se)-polysaccharide from Se-enriched *Grifola frondosa*," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 82, pp. 607–613, 2016.
- [13] C. Wu, W. Chen, and M. Fang, "Compound Astragalus and Salvia miltiorrhiza extract inhibits hepatocellular carcinoma progression via miR-145/miR21 mediated Smad3 phosphorylation," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 231, pp. 98–112, 2018.
- [14] L. Li, L. S. Lei, and C. L. Yu, "Changes of serum interferon-gamma levels in mice bearing S-180 tumor and the interventional effect of immunomodulators," *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, vol. 28, pp. 65–68, 2008.
- [15] Q. Cai, Y. Li, and G. Pei, "Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* attenuate microglia mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 14, p. 63, 2017.
- [16] J. Zhang, Q. Tang, C. Zhou et al., "GLIS, a bioactive proteoglycan fraction from *Ganoderma lucidum*, displays anti-tumour activity by increasing both humoral and cellular immune response," *Life Sciences*, vol. 87, no. 19–22, pp. 628–637, 2010.
- [17] Y. J. Li, J. Shen, Y. M. Xia, and J. Zhang, "The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells?" *Carbohydrate Polymers*, vol. 90, pp. 1210–1215, 2010.
- [18] J. Shen, H.-s. Park, Y.-m. Xia, G.-s. Kim, and S. W. Cui, "The polysaccharides from fermented *Ganoderma lucidum* mycelia induced miRNAs regulation in suppressed HepG2 cells," *Carbohydrate Polymers*, vol. 103, pp. 319–324, 2014.
- [19] Y. Yu, L. Qian, N. Du, Y. Liu, X. Zhao, and X. Zhang, "*Ganoderma lucidum* polysaccharide enhances radiosensitivity of hepatocellular carcinoma cell line HepG2 through Akt signaling pathway," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 14, no. 6, pp. 5903–5907, 2017.
- [20] X.-R. Peng, J.-Q. Liu, C.-F. Wang et al., "Hepatoprotective effects of triterpenoids from *Ganoderma cochlear*," *Journal of Natural Products*, vol. 77, no. 4, pp. 737–743, 2014.

- [21] A. Zong, H. Cao, and F. Wang, "Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research," *Carbohydrate Polymers*, vol. 90, no. 4, pp. 1395–1410, 2012.
- [22] M. T. K. Sipping, F. K. Mediesse, and A. Y. N. Sombes, "Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ganoderma resinaceum* (Boud) fruiting bodies extracts," *Journal of Herbmmed Pharmacology*, In press, 2022.
- [23] D. Hua, D. Zhang, B. Huang, P. Yi, and C. Yan, "Structural characterization and DPPH· radical scavenging activity of a polysaccharide from Guara fruits," *Carbohydrate Polymers*, vol. 103, pp. 143–147, 2014.
- [24] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254, 1976.
- [25] V. L. Singleton and J. A. Rossi, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 37, pp. 144–158, 1965.
- [26] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- [27] J. M. Barnes and G. E. Paget, "2 mechanisms of toxic action," *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 4, pp. 18–38, 1965.
- [28] K. Yagi, "A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma," *Biochemical Medicine*, vol. 15, no. 2, pp. 212–216, 1976.
- [29] A. K. Sinha, "Colorimetric assay of catalase," *Analytical Biochemistry*, vol. 47, no. 2, pp. 389–394, 1972.
- [30] J. M. McCord and I. Fridovich, "Superoxide dismutase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, no. 22, pp. 6049–6055, 1969.
- [31] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, 1959.
- [32] L. Marcocci, M. T. Droylefaix, and L. Packer, "The nitric oxide-scavenging properties of ginkgo biloba extract EGB 761," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 201, no. 2, pp. 748–755, 1994.
- [33] D. Delić, H. Ellinger-Ziegelbauer, H. W. Vohr, M. Dkhil, S. Al-Quraishy, and F. Wunderlich, "Testosterone response of hepatic gene expression in female mice having acquired testosterone-unresponsive immunity to *Plasmodium chabaudi* malaria," *Steroids*, vol. 76, pp. 1204–1212, 2011.
- [34] N. P. Santos, A. A. Colaço, and P. A. Oliveira, "Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: a review," *Tumour biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 39, no. 3, pp. 1–20, 2017.
- [35] G. Ramakrishnan, S. Jagan, S. Kamaraj, P. Anandakumar, and T. Devaki, "Silymarin attenuated mast cell recruitment thereby decreased the expressions of matrix metalloproteinases-2 and 9 in rat liver carcinogenesis," *Investigational New Drugs*, vol. 27, no. 3, pp. 233–240, 2009.
- [36] N. Fausto and J. J. Campbell, "Mouse models of hepatocellular carcinoma," *Seminars in Liver Disease*, vol. 30, no. 1, pp. 087–098, 2010.
- [37] R. Tolba, T. Kraus, C. Liedtke, M. Schwarz, and R. Weiskirchen, "Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice," *Laboratory Animals*, vol. 49, no. S1, pp. 59–69, 2015.
- [38] I. Badreddine, C. Lafitte, L. Heux et al., "Cell wall chitosaccharides are essential components and exposed patterns of the phytopathogenic oomycete *aphanomyces euteiches*," *Eukaryotic Cell*, vol. 7, pp. 1980–1993, 2008.
- [39] D. Michez, "Université de Mons, Eléments de botanique," 2016.
- [40] J. Weyermann, D. Lochmann, and A. Zimmer, "A practical note on the use of cytotoxicity assays," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 288, no. 2, pp. 369–376, 2005.
- [41] M. Zhang, X. Tang, F. Wang, Q. Zhang, and Z. Zhang, "Characterization of *Lycium barbarum* polysaccharide and its effect on human hepatoma cells," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 61, pp. 270–275, 2013.
- [42] C. Chen, M.-L. Wang, C. Jin et al., "*Cordyceps militaris* polysaccharide triggers apoptosis and G0/G1 cell arrest in cancer cells," *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 18, no. 3, pp. 433–438, 2015.
- [43] A. Li, X. Shuai, and Z. Jia, "*Ganoderma lucidum* polysaccharide extract inhibits hepatocellular carcinoma growth by downregulating regulatory T cells accumulation and function by inducing microRNA-125b," *Journal of Translational Medicine*, vol. 13, no. 100, 2008.
- [44] S. Fan, J. Zhang, W. Nie et al., "Antitumor effects of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 102, pp. 53–62, 2017.
- [45] Y. Hu, J. Zhang, L. Zou, C. Fu, P. Li, and G. Zhao, "Chemical characterization, antioxidant, immune-regulating and anticancer activities of a novel bioactive polysaccharide from *Chenopodium quinoa* seeds," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 99, pp. 622–629, 2017.
- [46] D. Belhaj, K. Athmouni, M. B. Ahmed et al., "Polysaccharides from *Phormidium versicolor* (NCC466) protecting HepG2 human hepatocellular carcinoma cells and rat liver tissues from cadmium toxicity: evidence from *in vitro* and *in vivo* tests," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 113, pp. 813–820, 2018.
- [47] Z. F. Zhang, G. Y. Lv, and X. Jiang, "Extraction optimization and biological properties of a polysaccharide isolated from *Gleostereum incarnatum*," *Carbohydrate Polymers*, vol. 117, pp. 185–191.
- [48] S. M. Shaarawy, A. A. Tohamy, S. M. Elgendy et al., "Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 5, pp. 549–557, 2009.
- [49] G. Chen, Z.-K. Dai, R.-G. Liang et al., "Characterization of diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis in Syrian golden hamsters," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 285–292, 2012.
- [50] B. Cui, Y. Chen, S. Liu et al., "Antitumour activity of *Lycium chinensis* polysaccharides in liver cancer rats," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 51, no. 3, pp. 314–318, 2012.
- [51] W. Liu, F. F. Gao, Q. Li et al., "Protective effect of Astragalus polysaccharides on liver injury induced by several different chemotherapeutics in mice," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 15, no. 23, pp. 10413–10420, 2014.
- [52] J. Xiao, F. Xing, J. Huo et al., "*Lycium barbarum* polysaccharides therapeutically improve hepatic functions in non-alcoholic steatohepatitis rats and cellular steatosis model," *Scientific Reports*, vol. 4, p. 5587, 2014.
- [53] S. R. Fahmy, A. I. Amien, F. M. Abd-Elgleel, and S. M. Elaskalany, "Antihepatotoxic efficacy of *Mangifera indica* L. polysaccharides against cyclophosphamide in rats," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 244, pp. 113–120, 2016.

- [54] A. J. Tien, C. Y. Chien, and Y. H. Chen, "Fruiting bodies of *Anurodia cinnamomea* and its active triterpenoid, antcin K, ameliorates N-Nitrosodiethylamine-Induced hepatic inflammation, fibrosis and carcinogenesis in rats," *The American Journal of Chinese Medicine*, vol. 45, no. 1, pp. 1-26, 2017.
- [55] H. Nyblom, U. Berggren, J. Balldin, and R. Olsson, "High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking," *Alcohol and Alcoholism*, vol. 39, no. 4, pp. 336-339, 2004.
- [56] S. Jayakumar, A. Madankumar, S. Asokkumar et al., "Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 360, no. 1-2, pp. 51-60, 2012.
- [57] I. Rusyn and J. C. Corton, "Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate," *Mutation Research: Reviews in Mutation Research*, vol. 750, no. 2, pp. 141-158, 2012.
- [58] M. Ganeshkumar, T. Ponrasu, M. K. Subamekala, M. Janani, and L. Suguna, "Curcumin loaded on pullulan acetate nanoparticles protects the liver from damage induced by DEN," *RSC Advances*, vol. 6, no. 7, pp. 5599-5610, 2016.
- [59] A. H. Fathy, M. A. Bashandy, S. A. E. Bashandy, A. M. Mansour, and B. Elsadek, "Sequential analysis and staging of a diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in male Wistar albino rat model," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 95, no. 12, pp. 1462-1472, 2017.
- [60] C. Sauzay, A. Petit, A.-M. Bourgeois et al., "Alpha-foetoprotein (AFP): a multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma," *Clinica Chimica Acta*, vol. 463, pp. 39-44, 2016.
- [61] S. J. Park, J. Y. Jang, S. W. Jeong et al., "Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma," *Medicine*, vol. 96, no. 11, Article ID e5811, 2017.
- [62] A. V. Thatishetty, N. Agresti, and C. B. O'Brien, "Chemotherapy-induced hepatotoxicity," *Clinics in Liver Disease*, vol. 17, no. 4, pp. 671-686, 2013.
- [63] G. Dranoff, "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 1, pp. 11-22, 2004.
- [64] E. Ferretti, V. Pistoia, and A. Corcione, "Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases with emphasis on B cell malignancies," *Mediators of Inflammation*, vol. 2014, Article ID 480941, 10 pages, 2014.
- [65] B. Yang, B. Xiao, and T. Sun, "Antitumor and immunomodulatory activity of *Astragalus membranaceus* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 62, pp. 287-290, 2013.
- [66] Z. Wang, B. Wu, X. Zhang et al., "Purification of a polysaccharide from *Boschniakia rossica* and its synergistic anti-tumor effect combined with 5-Fluorouracil," *Carbohydrate Polymers*, vol. 89, no. 1, pp. 31-35, 2012.
- [67] T. Matsubara, T. Ono, A. Yamanoi, M. Tachibana, and N. Nagasue, "Fractalkine-CX3CR1 Axis regulates tumor cell cycle and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 95, no. 3, pp. 241-249, 2007.
- [68] M. Zajkowska and B. Mroczko, "From allergy to cancer-clinical usefulness of eotaxins," *Cancers*, vol. 13, no. 1, p. 128, Article ID 13010128, 2021.
- [69] L. Verna, J. Whysner, and G. M. Williams, "N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bio-activation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 71, no. 1/2, pp. 57-81, 1996.
- [70] J. S. Kang, H. Wanibuchi, K. Morimura, F. J. Gonzalez, and S. Fukushima, "Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo," *Cancer Research*, vol. 67, no. 23, pp. 11141-11146, 2007.
- [71] K. Omura, T. Uehara, Y. Morikawa et al., "Detection of initiating potential of non-genotoxic carcinogens in a two-stage hepatocarcinogenesis study in rats," *Journal of Toxicological Sciences*, vol. 39, no. 5, pp. 785-794, 2014.
- [72] K. Athmouni, D. Belhaj, A. El Feki, and H. Ayadi, "Optimization, antioxidant properties and GC-MS analysis of *Periploca angustifolia* polysaccharides and chelation therapy on cadmium-induced toxicity in human HepG2 cells line and rat liver," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 108, pp. 853-862, 2018.
- [73] A. Hebatallah, Darwish, and N. A. El-Boghdady, "Possible involvement of oxidative stress in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis: chemopreventive effect of curcumin," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 37, pp. 53-361, 2013.
- [74] Y.-H. Song, Q. Liu, Z.-P. Lv, Y.-Y. Chen, Y.-C. Zhou, and X.-G. Sun, "Protection of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza*, a Chinese medicinal herb, against immunological liver injury in mice," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 43, no. 2, pp. 170-175, 2008.
- [75] U. K. Hussein, H. M. Mahmoud, A. G. Farrag, and A. Bishayee, "Chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted hepatocarcinogenesis in rats by sulfated polysaccharides and aqueous extract of *ulva lactuca*," *Integrative Cancer Therapies*, vol. 14, no. 6, pp. 525-545, 2015.
- [76] S. Shrivastava, N. Singh, A. K. Nigam, S. S. Chandel, R. Shrivastava, and S. Kumar, "Comparative study of hematological parameters along with effect of chemotherapy and radiotherapy in different stages of breast cancer," *International Journal of Research in Medical Sciences*, vol. 5, no. 1, pp. 311-315, 2016.
- [77] A. Mokh, D. Abdelhady, E. Ghazy, H. Aboumosalem, and W. Goda, "Sesame oil mitigates initiation stage of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in rats," *Slovenian Veterinary Research*, vol. 56, no. 22, pp. 487-498, 2019.
- [78] M. D. Selvamani and S. Thomas, "Evaluation of haematological abnormalities in decompensated chronic liver disease patients," *IOSR Journal of Dental and Medical Science*, vol. 16, no. 4, pp. 16-21, 2017.
- [79] B. I. Carr, *Hepatocellular Carcinoma Diagnosis and Treatment*, Springer, Berlin, Germany, 3rd edition, 2016.
- [80] R. T. Solomon, A. Aravind, and C. K. Selvi, "A study on hematological abnormalities in chronic liver diseases," *Journal of Dental and Medical Sciences*, vol. 16, no. 6, pp. 38-44, 2017.



Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ganoderma resinaceum* (Boud) fruiting bodies extracts

Marius Trésor Kemegne Sipping^{1,2}, Francine Kengne Mediesse^{1,3}, Annette Yannuvie Natia Sombes¹, Adamou Mfopa^{1,3}, Thaddée Boudjeko^{1,4*}

¹Laboratory of Phytoprotection and Valorization of Genetic Resources, Biotechnology Centre-Nkolbisson, University of Yaoundé 1, P.O. Box 17673, Etetak, Yaoundé, Cameroon

²Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé 812, Cameroon

³Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies, P.O. Box. 13033, Yaoundé, Cameroon

⁴Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

ARTICLE INFO

Article Type:

Original Article

Article History:

Received: 9 November 2021

Accepted: 21 January 2022

Keywords:

Ganoderma resinaceum

Antioxidant

Inflammation

Cytokines

Chemokines

ABSTRACT

Introduction: *Ganoderma resinaceum* is used to treat oxidative and inflammatory-related diseases such as cardiovascular and liver diseases. Thus, this study aimed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of different extracts from *G. resinaceum* fruiting bodies.

Methods: Aqueous crude (GRT), mycelial (MYC), exopolysaccharide (EPS I, EPS II) and water-soluble polysaccharide-rich (GRP I and GRP II) extracts of *G. resinaceum* were assessed for their free radical scavenging and metal chelating ions assays. The *in vitro* anti-inflammatory activity was evaluated by stabilization of erythrocytes' membranes and protein denaturation assays. For the *in vivo* study, paw oedema was induced by administration of κ -carrageenan (0.1 mL; 1%) to male Wistar rats aged 4 to 6 weeks. Animals were pre-treated with *G. resinaceum* extracts (125 mg/kg) and diclofenac sodium (20 mg/kg). Inflammatory cytokine and chemokine levels were determined, and histological analysis of paw tissue was performed.

Results: *G. resinaceum* polysaccharide-rich extracts (GRP I and GRP II) showed the best bioactivities. They scavenged DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzylthiazoline-6-sulfonic acid, and NO (nitric oxide) radicals, and chelated ferrous ions, stabilized murine erythrocyte membranes, and inhibited protein denaturation. At 125 mg/kg, GRP I and GRP II restored the microarchitecture with a weak infiltration of immune cells in the subcutaneous tissues. Moreover, they decreased the overproduction of proinflammatory cytokines growth colony-stimulating factor (G-CSF), interferon gamma (IFN γ), tumour necrosis factor alpha (TNF α), chemokines (eotaxin, fractalkine) and increased the levels of anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-12p70).

Conclusion: *G. resinaceum* polysaccharide extracts could be potent antioxidant and anti-inflammatory agents.

Implication for health policy/practice/research/medical education:

Research on safe and novel potential antioxidant and anti-inflammatory agents from medicinal plants such as mushrooms is necessary to palliate the side effects of anti-inflammatory drugs in long-term use. This article valorises *G. resinaceum* polysaccharide-rich extracts as an alternative phytodrug for this purpose.

Please cite this paper as: Sipping KMT, Mediesse KF, Sombes AYN, Mfopa A, Boudjeko T. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ganoderma resinaceum* (Boud) fruiting bodies extracts. J Herbmed Pharmacol. 2022;11(3):348-359. doi: 10.34172/jhp.2022.40.

Introduction

Oxidative stress is an imbalance between oxidants and antioxidants in favour of oxidants, leading to a disruption of redox signalling, molecular damage,

mutation, and cell death. Thus, reactive oxygen/nitrogen species are the end products of essential biological processes such as metabolism and respiration, and can initiate an intracellular signalling cascade that enhances

*Corresponding author: Thaddée Boudjeko,
E-mail: boudjeko@yahoo.com

proinflammatory gene expression (1-3). In the human body, the mechanism of defence against physical, chemical, and biological attacks is ensured by inflammation. The latter is generally characterized by redness and swelling of tissues, which is associated with hyperthermia and pain (4). During the acute inflammatory response, immune cells, including macrophages, lymphocytes, neutrophils, mast and dendritic cells, are recruited reactive oxygen species (ROS), and different inflammatory mediators are secreted to stop the spread of cellular injury (5). Exposure to external factors such as heat and chemicals modifies the tertiary structure and secondary structure of proteins (6). Moreover, lysosomal constituents of activated neutrophils, such as bactericidal enzymes and proteases, cause further tissue inflammation and damage upon extracellular release (7). Therefore, anti-denaturation of proteins and stabilization of human erythrocyte membranes are adopted as possible mechanisms of *in vitro* inflammatory activities.

Carrageenan-induced paw oedema is a well-established model for studying the *in vivo* anti-inflammatory activities of natural or synthetic products. The administration of carrageenan leads to an increase in inflammatory and oxidative stress mediators, including histamine, prostaglandins, pro-inflammatory cytokines/chemokines, neutrophil-derived free radicals, and nitric oxide (8). It is clearly known that oxidative stress and inflammation are cross linked with a number of chronic diseases, including diabetes, hypertension, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, alcoholic liver disease, chronic kidney disease, cancer, and aging (9). The use of analgesic drugs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, steroidal anti-inflammatory drugs, and opioids is strongly recommended. However, these factors cause deleterious effects on human health in the long run (10). Despite the efficiency of conventional methods to overwhelm these side effects, research on safe and novel potential antioxidant and anti-inflammatory agents from medicinal plants, such as mushrooms, has been carried out. Bioactive compounds isolated from medicinal plants have been widely used for the last decades in South America, Asia, and Africa as part of traditional diets and medicines.

Polysaccharides have been reported to exhibit various biological activities, such as hypoglycaemic, hypolipidemic, antiviral, antitumour, immunomodulatory, antioxidant and anti-inflammatory activities (11-13). Hence, mushroom-derived polysaccharides have particularly attracted much attention in the field of biochemistry and pharmacology to treat the aforementioned diseases (14). One of the most commonly studied and exploited mushrooms for this purpose is lignicolous basidiomycetes belonging to the *Ganodermataceae* family, such as *Ganoderma lucidum* "Reishi". It has been demonstrated that alcoholic and aqueous extracts of *Ganoderma resinaceum* fruiting bodies have hypoglycaemic, hepatoprotective, antibacterial, and antioxidant activities (15-17). This

justifies their use in African and Asian mycotherapy to treat hypoglycaemia and cardiovascular and liver diseases. Due to the seasonal nature of mushroom production, the innocuity of polysaccharides and their solubility in the current extraction solvents, many techniques have been developed for their production and isolation, including liquid fermentation and fed-batch culture (18). Therefore, the present study focused on the comparative investigation of crude, mycelial, water-soluble polysaccharide and exopolysaccharide extracts for their antioxidant and anti-inflammatory activities.

Materials and Methods

Chemicals, reagents, drugs, and kits

Diclofenac sodium (product number: 15307-79-6, molecular formula: $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2-Na$) as a white powder packaged in a one gram box, purity $\geq 98\%$, concentration 25 mg/mL) and κ -carrageenan (product number: 11114-20-8, solid-state, white colour, concentration 5 mg/mL) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany. The rat cytokine/chemokine bead panel was supplied from EMD Millipore Corporation (USA). Chemical reagents for antioxidant assays were purchased from GIBCO (Grand Island, NY, USA). All of the chemicals were analytical grade.

Extracts preparation

Crude extract preparation

G. resinaceum fruiting bodies were collected locally and authenticated in comparison to voucher specimen DM 764 at the Laboratory of Mycology of University of Yaoundé 1, Cameroon. The crude extract was obtained according to the modified protocol of Liu et al (19). The mushrooms were cut into small pieces, air-dried in the shade at room temperature and ground. The powder of *G. resinaceum* (100 g) was boiled in distilled water (1:15; w/v) at 100°C for 90 minutes and the solution obtained was cooled at room temperature, then filtered using Whatman paper N° 10. The filtrate was freeze-dried to obtain an aqueous crude extract of *G. resinaceum* (GRT).

Isolation of water-soluble polysaccharides

G. resinaceum polysaccharide-rich extracts were obtained as described by Hua et al (20) with slight modifications. Briefly, the powder (650 g) was sieved and incubated in 6 L of 50% methanol at room temperature for 24 hours. Then, the mixture was filtered using Whatman paper N° 10 and dried at 40°C for 2 hours. The residue in distilled water 1:15 (w/v) was boiled at 80°C for 2 hours and filtered with Whatman paper N° 10. The polysaccharides were precipitated by stepwise addition of ethanol to concentrations of 60% and 80%. After centrifugation (5000 g, 20 minutes), the pellet was re-suspended in distilled water, dialyzed against distilled water (MWCO 14.000), and freeze-dried for further analysis. The polysaccharide-rich fractions precipitated by 60 and 80% were termed

GRP I and GRP II, respectively.

Preparation of mycelial extract

Mycelial extract of *G. resinaceum* (MYC) was obtained with respect to the modified protocol of Kim et al (21). Freshly harvested fruiting bodies were washed and sterilized by soaking basidiocarps three times in 95% ethanol, 3% hydrogen peroxide and distilled water. Then, sterile basidiocarps were inoculated on sterile PDA medium in petri dishes. Mycelia were grown after 07 days of incubation at 30°C. The 5 mm agar disks of mycelium were fermented on MCM by shaking (Excelsa E24) at 150 rpm at 30°C for 4 days. The culture broth was centrifuged (10000 g, 20 minutes), and the pellet collected was re-suspended in distilled water and freeze-dried.

Production and isolation of exopolysaccharides

G. resinaceum was initially grown on Potatoes' Dextrose Agar (PDA) medium in a Petri dish and then transferred into the seed culture medium by punching out 5 mm of the agar plate culture with a house-developed cutter. The precultures were carried out in 250 mL flasks containing 50 mL of MCM pH=6 (20 g/L glucose, 2 g peptone, 2 g yeast extract, 0.46 g KH_2PO_4 , 1 g K_2HPO_4 and 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) at 25°C for 4 days using 4% (v/v) inoculum. The mixture was further transferred into 500 mL shake flasks containing 125 mL of MCM pH=6 composed of glucose: 35 g/L; peptone: 8 g/L, yeast extract: 2 g/L; K_2HPO_4 : 1 g/L; KH_2PO_4 : 0.46 g/L, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g/L. All experiments were performed at least in triplicate to ensure reproducibility. Fermentations were carried out in Mushroom Complete Medium at 150 rpm at 25°C for 14 days on a shaker (Excelsa E24). Culture broths were centrifuged at 10000 g for 20 minutes. The resulting supernatant was then filtered through Whatman N° 10, and the filtrate collected was precipitated by stepwise addition of ethanol to concentrations of 60% and 80%, stirred vigorously and kept overnight at 4°C. The mixtures were separately centrifuged at 5000 g for 15 minutes, and the collected pellets were re-suspended in distilled water. The exopolysaccharide extracts precipitated by 60 and 80% were named EPS I and EPS II, respectively.

Antioxidant assays

Antioxidant activities were determined based on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis-3-ethylbenzylthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and nitric oxide radical scavenging activities and as well as the ferrous ion chelating assay.

DPPH scavenging activity

DPPH is a stable free radical characterized by the delocalization of spare electrons over the molecule, but the free radicals formed cannot dimerize like others. The DPPH quenching ability was measured as described by Katalinić et al (22). In each test tube, 0.5 mL of a different

G. resinaceum extract at various concentrations (25-200 µg/mL) was mixed with 0.5 mL of the freshly prepared solution of 400 µmol/L DPPH. After incubation at 25°C for 30 minutes in darkness, the absorbance was read at 517 nm using a UV-1605 Shimadzu spectrophotometer. Ferulic acid was used as standard. The DPPH activity of the extract was determined using the following equation: (%) = $\{[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100\}$, where A_0 is the absorbance of the control reaction and A_1 is the absorbance in the presence of the sample.

ABTS scavenging assay

The ABTS free radical scavenging activity was carried out using a previously described method (23). To this effect, 0.5 mL of different concentrations of *G. resinaceum* extract (25 - 200 µg/mL) or the reference compound ferulic acid was added to 0.5 mL of ABTS reagent, the mixture was homogenized and kept in the dark for 30 min at room temperature. The absorbance was then measured at 734 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. The ABTS radical scavenging effect of the fraction was calculated using the equation in the preceding section.

Nitric oxide (NO) radical scavenging activity

The Griess reagent was used to quantify nitrite, which is a stable product of NO oxidation (24). In the test tubes, 0.25 mL of different *G. resinaceum* extracts were introduced (25-200 µg/mL) and 1 mL of Sodium Nitroprusside (SNP) (10 mM) was added. The mixture was incubated at room temperature for 90 minutes. Thereafter, 1 mL of this mixture was mixed with 0.5 mL of fresh Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene-diamine in 5% HCl, V/V). The violet colour obtained was measured at 540 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. The inhibition percentage was calculated using the following formula:

% Inhibition of NO radical = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 is the absorbance before the reaction and A_1 is the absorbance after reaction, taken place with Griess reagent.

Ferrous ions chelating assay

The ferrous metal ion chelating activities of *G. resinaceum* extracts were investigated according to the method of Dinis et al (25) with slight modifications. Briefly, samples at different concentrations (25-200 µg/mL) were introduced in test tubes containing 0.05 mL FeCl_2 (2.0 mM), shaken well, and kept still for 1 min at room temperature. Thereafter, 0.1 mL ferrozine (5.0 mM) was added. The mixture was incubated in the dark for 30 min, and the absorbance was determined at 562 nm. EDTA was used as positive control. The ferrous ion chelating activity was given by the following equation:

Chelating ability (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 was the absorbance of the control and A_1 was the absorbance in the presence of the sample.

Stabilization membrane assay

Preparation of erythrocyte suspension

Fresh whole rat blood (10 mL) was collected and transferred to heparinized tubes. The tubes were centrifuged at 2500 g for 30 minutes and washed three times with an equal volume of normal saline. The volume of the blood was measured and reconstituted as a 10% v/v suspension with normal saline.

Heat induced haemolysis

The reaction mixture (2 mL) consisted of 1 mL of *G. resinaceum* extracts at concentrations ranging from 0.5 to 2.5 mg/mL, 1 mL of phosphate buffer 0.15 M (pH 7.4) and 0.5 mL of 10% RBC suspension, instead of drug, only saline was added to the control test tube. Ibuprofen was taken as a standard drug. All centrifuged tubes containing the reaction mixture were incubated at 56°C for 30 minutes. After cooling and centrifugation (2500 g; 20 minutes), the absorbance of the supernatants was measured at 560 nm. The experiment was performed in triplicates. The percentage membrane stabilization activity was calculated by the formula mentioned below:

$$\text{Inhibition of haemolysis (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

where A_0 is the absorbance of the control and A_1 is the absorbance in the presence of the samples.

Denaturation of proteins assay

The inhibitory effects of *G. resinaceum* extracts were assayed as described previously by Mehta et al (26) with slight modifications. Briefly, 0.1 mL of albumin from fresh chicken eggs was mixed with 1.9 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 6.4) and 1 mL of varying concentrations (100-500 µg/mL). Diclofenac sodium at the same concentrations was used as a reference drug. The mixtures were further incubated at 37°C for 20 minutes and heated at 70°C for 5 minutes. Then, the cooling optical density (OD) was read at 660 nm on a UV-1605 Shimadzu spectrophotometer against distilled water as a blank. The percentages of inhibition were determined as follows:

$$\% \text{ Inhibition} = [(O.D._{\text{sample}} - O.D._{\text{control}})/O.D._{\text{control}}] \times 100.$$

κ-Carrageenan induced rat paw oedema

Nine groups of five animals each were constituted of male *Wistar* rats weighing between 150 and 200 g. Paw oedema was induced in the left hind paw of each rat by intraplantar injection of 0.1 mL of 1% κ-carrageenan suspended in saline. One hour prior to carrageenan injection, the rats were pre-treated with either sterile (0.9% NaCl w/v, s.c.), EPS I, EPS II, GRP I, GRP II, MYC, GRT (125 mg/kg, p.o.) or diclofenac sodium (20 mg/kg, p.o.) as a reference. The paw volume of rats was measured by a plethysmometer (Ugo Basile, Varese, Italy) at zero time and then 1, 3, and 5 hours after injection of carrageenan (27). The variations in paw volume were expressed as percentages using the

formula below:

$$\frac{V_c - V_t}{V_c} \times 100$$

where V_c and V_t represent the mean increase in paw volume of the control and treated groups, respectively. The animals were sacrificed after 5 hours of carrageenan challenge by cervical decapitation. Subplantar tissues of the hind paw were removed, rinsed in ice-cold normal saline, and immediately homogenized in NaCl (0.9%) to give a 10% homogenate suspension used for measuring oxidative stress markers. Blood was further withdrawn, and the prepared serum was kept at -80°C to determine inflammatory marker levels.

Preparation of paw tissues for histopathology

The paws collected for histopathological observations were decalcified in 5% nitric acid, processed for paraffin embedding, and sectioned at a thickness of 5 µm with a rotating microtome (Leitz 1512, Marshall Scientific, Hampton, USA). The paw slices were stained with haematoxylin & eosin (H&E) for examination under a light microscope (Axiokop 40). The micrographs were analysed histologically by an independent observer.

Determination of inflammatory mediators' levels

The measurement of cytokines growth colony-stimulating factor (G-CSF), interferon gamma (IFN-γ), tumour necrosis factor (TNF)-α, interleukins (IL)-10, 12p70, and chemokines (eotaxin, fractalkine) in serum and paw homogenates was performed using the Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (EMD Millipore Corporation, Massachusetts, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, 25 µL of samples/standards and 25 µL of magnetic beads in solution were added successively to appropriate wells. The plate was incubated for 2 hours at room temperature and washed twice with 1X wash buffer. A second incubation of 1 hour was performed on an orbital shaker at 1000 rpm after adding 25 µL of detection antibodies, and Streptavidin-Phycoerythrin (25 µL) was added. The plate was newly incubated for 30 minutes at room temperature, washed, resuspended in 125 µL of sheath fluid, and read on a MAGPIX® instrument (Luminex, USA).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± standard error mean (SEM) for each experimental group or treatment. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Software version 5.03 (San Diego, CA, USA) using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered to be significant. Data obtained from cytokines/chemokines level determination were analysed using Luminex xPONENT® multiplex assay software.

Results

Antioxidant activities

The scavenging activity of *G. resinaceum* extracts against DPPH and ABTS revealed a concentration-dependent effect from 25 to 200 µg/mL compared to ferulic acid. GRP I exhibited the highest scavenging activity with EC₅₀ values of 24.20 and 135.7 µg/mL, respectively. Meanwhile, *G. resinaceum* extracts significantly scavenged nitric oxide at the tested concentrations. GRP I showed the best NO scavenging activity, with an EC₅₀ of 97.42 µg/mL.

G. resinaceum extracts were also found to significantly chelate metal ions at all tested concentrations. However, the *G. resinaceum* polysaccharides exhibited the highest antioxidant effects (Table 1).

Erythrocytes stabilizing membranes

G. resinaceum extracts significantly inhibited lysis of rats' erythrocytes membranes within the range of 1.48 ± 1.13% to 74.07 ± 2.71% at the tested concentrations (100-500 µg/mL). GRP I and GRP II displayed the highest inhibition (74.07 ± 2.71 and 69.46 ± 5.16%, respectively) of erythrocyte membrane haemolysis compared to Ibuprofen (93.52 ± 2.97%) at 500 µg/mL. In addition, minimal inhibitory capacity was noticed with mycelial extracts (1.48 ± 1.13%) at 100 µg/mL (Figure 1). The stabilization of erythrocyte membranes suggested preservation of lysosomal membranes because of their structural similitudes.

Anti-denaturation of proteins

The effects of *G. resinaceum* extracts on albumin-induced denaturation are depicted in Figure 2. The results showed a significant inhibitory capacity of protein denaturation ranging from 13.20 ± 2.88% to 64.03 ± 1.17% depending on the concentrations of *G. resinaceum* extracts (100-500 µg/mL). The lowest effects were observed with GRT and MYC (13.20 ± 2.88% and 13.68 ± 1.17%, respectively). However, GRP II exhibited the highest inhibitory percentages of 64.03 ± 1.17 at 500 µg/mL compared to diclofenac sodium (74.17 ± 1.32%) used as a reference drug.

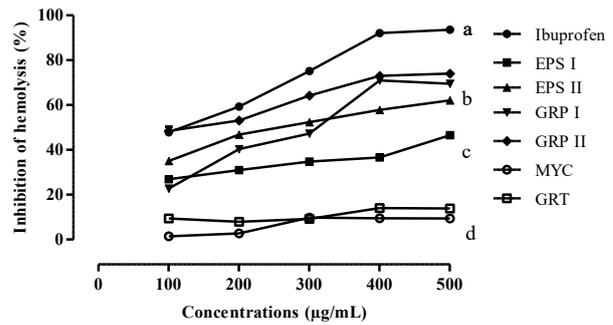


Figure 1. Inhibition of HRBCs membranes' haemolysis (%) by Ibuprofen and extracts of *G. resinaceum* fruiting bodies. Means ± SEM with different superscript letters (a, b, c, d) are significant at *P* < 0.05 using one-way ANOVA test (n= 3). EPS I and EPS II: Animals that received the polysaccharide extracts at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; GRP I and GRP II: Animals that received the polysaccharide extracts at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; MYC: Animals that received the mycelial extract at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; GRT: Animals that received the crude extract of *G. resinaceum* at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.

Effects of *G. resinaceum* extracts on carrageenan-induced paw-oedema

The administration of carrageenan solution induced oedema in hind paw skin. Consequently, carrageenan enhanced the development of the vascular phase of inflammation. Both diclofenac sodium (20 mg/kg) and *G. resinaceum* extracts (125 mg/kg) pre-treatment inhibited the formation of paw edema in a time-dependent manner 1, 3, and 5 hours after carrageenan administration (Table 2). Interestingly, the most pronounced effect was noticed following GRP II administration after 3 hours (96.3 ± 2.95%) (*P* < 0.001), whereas diclofenac sodium exhibited 74.96 ± 3.92% after 5 hours when compared with the negative control group. The highest inhibitory activity of GRP II was confirmed, with the lowest diameter (4.54 ± 0.60 cm) of the hind paw noticed after 3 hours of carrageenan injection (*P* < 0.01). These results highlighted the anti-oedematous actions of *G. resinaceum* extracts at early and late phases of acute inflammation.

Table 1. Extraction yield and antioxidant activities of *G. resinaceum* extracts

	EC ₅₀ (µg/mL)				
	Yield	DPPH	ABTS	Fe ²⁺ chelating ions	NO scavenging
EPS I	0.12 g/L	58.51	153.7	153.8	319.5
EPS II	0.19 g/L	43.50	136.7	153.6	361.7
GRP I	0.2%	24.20	135.7	110.1	97.42
GRP II	0.6%	43.13	107.5	114.8	119.7
MYC	1.5 g/L	129.4	207.8	86.18	664.1
GRT	1.12%	169.1	180.8	99.20	301.0

EC₅₀: Concentration of *G. resinaceum* polysaccharide extracts leading to 50% antioxidant activity; DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2-azino-bis-3-ethylbenzylthiazoline-6-sulfonic acid; NO: Nitric oxide radical scavenging activities; EPS: Animals that received the polysaccharide extracts EPS I and EPS II at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; GRP I and GRP II: Animals that received the polysaccharide extracts at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; MYC: Animals that received the mycelial extract at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; GRT: Animals that received the crude extract of *G. resinaceum* at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.

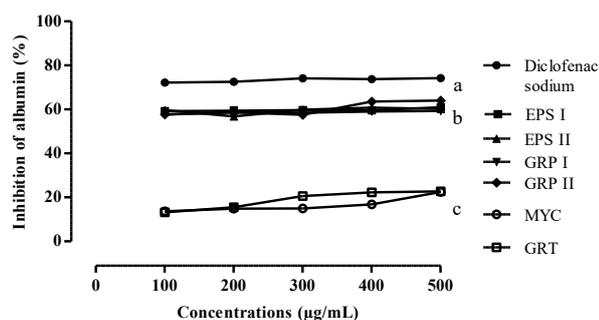


Figure 2. Effects of *G. resinaceum* extracts and diclofenac sodium against protein denaturation. Means \pm SEM with different superscript letters (a, b, c) are significant at $P < 0.05$ using one-way ANOVA test. (n= 3). EPS I and EPS II: Animals that received the polysaccharide extracts at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; GRP I and GRP II: Animals that received the polysaccharide extracts at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; MYC: Animals that received the mycelial extract at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; GRT: Animals that received the crude extract of *G. resinaceum* at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.

Effects of *G. resinaceum* extracts on histopathological changes in paw tissues.

The representative histopathology of paw tissues of the experimental groups is illustrated in Figure 3. The paw tissues of carrageenan-injected rats revealed epithelial hyperplasia and infiltration of inflammatory cells, whereas the normal group showed an absence of these signs. The different treatment-based *G. resinaceum* extracts protected

paw tissues against these malformations. Likewise, the anti-inflammatory response of GRP-treated rats at 125 mg/kg was close to that exerted by diclofenac sodium at 20 mg/kg.

Effects of *G. resinaceum* extracts on cytokine/chemokines release.

To further investigate the mechanism of action of *G. resinaceum* extracts in inflammation, pro-inflammatory (G-CSF, TNF α), anti-inflammatory (IL-10, IL-12p70), and chemokines such as eotaxin and fractalkine were determined using the multiplex Luminex technique. The results are presented in Figures 4 and 5. Carrageenan injection induced a significant increase in G-CSF and TNF α levels in both serum and subcutaneous tissue compared to the normal group ($P < 0.001$). In contrast, the treatments with GRP (125 mg/kg) and diclofenac sodium (20 mg/kg) induced a significant depletion of those pro-inflammatory cytokines ($P < 0.001$; $P < 0.01$) in both serum and paw tissue in comparison with the negative control group. On the other hand, there was significant decreases in IL-10 ($P < 0.01$; $P < 0.05$) and IL-12p70 ($P < 0.05$; $P < 0.001$) in the negative control group compared with the normal control group. GRP and diclofenac sodium induced an increase in IL-10 and IL-12p70 levels compared to the negative control group. Carrageenan administration also provoked a significant increase in eotaxin ($P < 0.05$; $P < 0.001$) and fractalkine ($P < 0.01$) levels in both serum and paw tissues

Table 2. Acute anti-inflammatory effects of *G. resinaceum* extracts and diclofenac sodium on carrageenan induced paw oedema in rats

Groups	Time (h)			
	Hind paw diameter (cm)			
	0	1 h	3 h	5 h
	Oedema inhibition (%)			
NOR	4.31 \pm 0.46	4.31 \pm 0.46**	4.31 \pm 0.46**	4.31 \pm 0.46*
NC	3.97 \pm 0.16	5.28 \pm 0.28 0	5.63 \pm 0.32 0	5.14 \pm 0.17 0
PC	4.13 \pm 0.10	5.21 \pm 0.09 24.53 \pm 2.31	5.17 \pm 0.28 62.51 \pm 5.27	4.56 \pm 0.19 74.96 \pm 3.92
EPS I	4.59 \pm 0.44	5.76 \pm 0.52 14.3 \pm 3.35##	5.88 \pm 0.26 37.1 \pm 2.51##	5.19 \pm 0.37 55.3 \pm 4.18##
EPS II	4.76 \pm 0.29	5.71 \pm 0.37 36.9 \pm 3.91###	5.56 \pm 0.43 86.3 \pm 2.11####	5.17 \pm 0.29 76.1 \pm 3.47
GRP I	4.27 \pm 0.41	5.07 \pm 0.32** 52.1 \pm 3.97###	5.11 \pm 0.50** 82.5 \pm 5.10####	4.54 \pm 0.45* 91.1 \pm 4.56####
GRP II	4.21 \pm 0.59	5.00 \pm 0.57** 52.5 \pm 3.46###	4.91 \pm 0.77** 96.3 \pm 2.95####	4.54 \pm 0.6** 84.1 \pm 2.66###
MYC	4.35 \pm 0.17	5.48 \pm 0.23* 18.5 \pm 1.00	5.32 \pm 0.18** 70.1 \pm 5.79	4.79 \pm 0.28* 74.1 \pm 2.97
GRT	4.03 \pm 0.25	5.19 \pm 0.34** 16.1 \pm 3.68##	4.99 \pm 0.21** 70.9 \pm 2.84#	4.34 \pm 0.20** 86.9 \pm 3.05##

Data are presented as mean \pm standard error followed by oedema inhibition percentage. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared to the Negative Control. #### $P < 0.001$; ### $P < 0.01$ and # $P < 0.05$ compared to the positive control. **NOR:** Normal control (animals that received only 0.9% NaCl p.o.); **NC:** Negative Control (animals that received 100 μ L of 1% κ -Carrageenan solution + 0.9% NaCl i.p.); **PC:** Positive Control (animals that received diclofenac sodium at 20 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.); **EPS:** Animals that received the polysaccharide extracts EPS I and EPS II at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; **GRP:** Animals that received the polysaccharide extracts GRP I and GRP II at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; **MYC:** Animals that received the mycelial extract (MYC) at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; **GRT:** Animals that received the crude extract of *G. resinaceum* (GRT) at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.

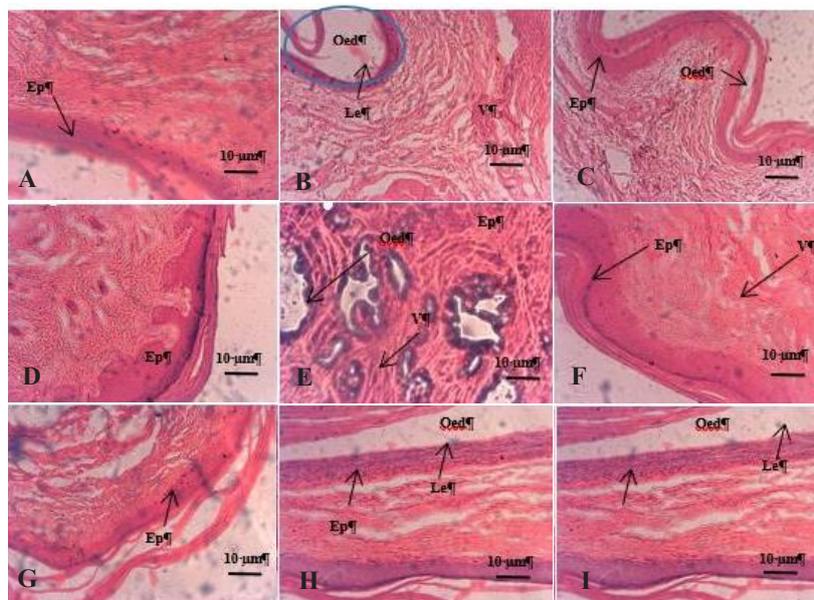


Figure 3. The representative photomicrographs of left hind paw tissue sections from the experimental groups (HE ×400).

The paw tissues of carrageenan-injected rats revealed epithelial hyperplasia and infiltration of inflammatory cells, whereas the normal group showed an absence of these signs. The different treatment-based *G. resinaceum* extracts protected paw tissues against these malformations. Likewise, the anti-inflammatory response of GRP-treated rats at 125 mg/kg is close to that exerted by diclofenac sodium at 20 mg/kg.

NOR: Normal Control (animals that received only 0.9% NaCl p.o.); **NC:** Negative Control (animals that received 100 µL of 1% κ-carrageenan solution + 0.9% NaCl i.p.); **PC:** Positive Control (animals that received diclofenac sodium at 20 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.); **EPS:** Animals that received the polysaccharide extracts EPS I and EPS II at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; **GRP:** Animals that received the polysaccharide extracts GRP I and GRP II at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; **MYC:** Animals that received the mycelial extract (MYC) at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; **GRT:** Animals that received the crude extract of *G. resinaceum* (GRT) at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; Ep: Epidermis; Le: Leucocytes; Oe: Oedema; V: Congested vessels swollen with erythrocytes.

in comparison with the normal groups. Meanwhile, the reference drug and *G. resinaceum* extracts caused a significant increase of these chemokines compared with the negative control group.

Discussion

We herein investigated the antioxidative and anti-inflammatory activities of *G. resinaceum* extracts. To achieve this goal, 06 extracts [Crude extract (GRT), Water polysaccharide extracts (GRPI and GRPII), Mycelial extract (MYC) and exopolysaccharide extracts: (EPS I and EPS II)] were obtained with different yields. In fact, the extraction yield of polysaccharides depends on the nature of the solvent (acidic, neutral, alkaline), number of repetitions, solute-to-solvent ratio, particle size, temperature, and extraction time (28). Moreover, liquid fermentation of a substrate can be influenced by the environment, pH of the medium, and nature of the culture medium (18,20).

In most living organisms, metabolism ensures the production of energy by the oxidation of organic compounds necessary for vital functions at the cellular level. Despite the importance of oxidations, the latter can, if uncontrolled, generate ROS, which in excess levels are harmful to human health (29). Biocompounds derived from mushrooms as polysaccharides can be exploited as antioxidants to protect our bodies from oxidative damage

by diverse mechanisms, including radical scavenging, reductive capacity, prevention of chain initiation, and binding to the transition metal ion catalysts. DPPH, ABTS, NO[•] scavenging and metal chelation assays are widely used to determine the total antioxidant activities of single compounds or complex mixtures of various plants (30). In the current study, *G. resinaceum* polysaccharide extracts (GRP I and GRP II) showed higher free radical scavenging and nitric oxide quenching properties than crude, mycelial, and exopolysaccharide extracts. As a free radical, NO is implicated in the physiology and pathology of many systems (31,32). Metal ions accelerate lipid peroxidation by breaking down hydrogen and lipid peroxides formed by the Fenton free radical reaction. The *G. resinaceum* polysaccharide extracts could exert their antioxidant activities through hydrogen-donating ability to form more stable radicals, regulating NOS activity to inhibit nitrite formation and chelating metal ions (33-35). The potent *in vitro* antioxidant activities of *G. resinaceum* polysaccharide fractions could be attributed to their chemical content since phenolic compounds (data not shown) are known as antioxidant compounds (36,37). Oxidative stress can induce inflammation through diverse pathways including activation of the transcription factor NF-κB and NOD-like receptor protein 3 inflammasome leading to the maturation of pro-inflammatory cytokines and chemokines (38).

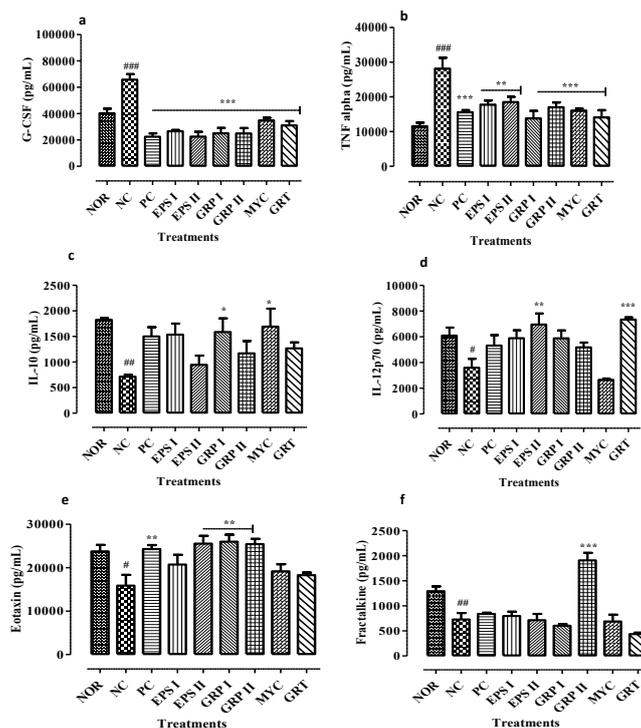


Figure 4. Effects of *G. resinaceum* extracts (125 mg/kg) or diclofenac sodium (20 mg/kg) on serum cytokines (G-CSF, TNF- α , IL-10, IL-12p70) and chemokines (Eotaxin and Fractalkine) levels in carrageenan induced paw oedema in Wistar rats.

(a) G-CSF: Growth Colony Stimulating Factor; **(b) TNF- α :** Tumour Necrosis Factor-alpha, **(c) IL-10:** Interleukin-10, **(d) IL-12p70:** Interleukin-12p70; **(e) Eotaxin;** **(f) Cytokine/chemokine levels,** which are represented as mean \pm SD ($n = 5$). ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$ compared to normal group, # $P < 0.05$ compared to normal group, * $p < 0.05$ compared to negative control, ** $P < 0.01$ compared to negative control, *** $P < 0.001$ compared to negative control. NOR: Normal control (Animals that received only 0.9% NaCl i.p.); NC: Negative control (Animals that received 100 μ L of 1% κ -carrageenan solution + 0.9% NaCl i.p.); PC: Positive control (Animals that received diclofenac sodium at 20 mg/kg + 0.9% NaCl p.o); EPS: Animals that received the polysaccharide extracts EPS I and EPS II at a dose 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; GRP: Animals that received the polysaccharide extracts GRP I and GRP II at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o); MYC: Animals that received the Mycelial extract (MYC) at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.; GRT: Animals that received the crude extract of *G. resinaceum* (GRT) at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.

The *in vitro* anti-inflammatory activities of *G. resinaceum* extracts were evaluated by membrane stabilization and protein denaturation assays. Exposure to substances such as phenyl-hydrazine, methyl salicylate, hypotonic solutions, or heat leads to haemoglobin oxidation and haemolysis (39). Among *G. resinaceum* extracts, the polysaccharide extracts showed the best erythrocyte membrane protective effects against heat-induced haemolysis. This suggests their ability to preserve the integrity of the plasma membrane which is inextricably linked to cell viability. Because the membranes of erythrocytes and lysosomes are structurally similar, the ability to stabilize the erythrocyte membrane may also help protect the lysosome membrane. This mechanism prevents release into serum proteins in tissues that can activate neutrophils and lengthen the inflammatory response (40). Uncontrolled or prolonged activation of inflammation can cause dangerous alterations, such as protein denaturation that produces auto antigens. These are associated with type III hypersensitivity reaction and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. The possible mechanism of denaturation is the alteration of electrostatic, hydrogen, hydrophobic, and disulfide bonds

that maintain the three-dimensional structure of proteins (41). The strong inhibitory activity of the *G. resinaceum* polysaccharide extracts found in this study could be explained by the interaction of some components as polysaccharides with two sites present in some proteins such as ovalbumin of tyrosine-, threonine- and lysine-rich bonds. The polysaccharides of *G. resinaceum* would therefore be able to control the production of auto-antigens by inhibiting protein denaturation.

Carrageenan is a phlogogenic agent whose administration leads to a biphasic inflammatory reaction. The initial or early phase lasts 90 minutes after injection of carrageenan and is characterized by the release of histamine, serotonin and bradykinin. The late phase can last up to 5 hours after the injection of carrageenan and is characterized by neutrophil infiltration and the release of prostaglandin mediated by cyclooxygenases. These mediators increase capillary permeability; thus, an exudate is formed that is responsible for the oedema that compresses the nerves and causes the sensation of pain (42,43). In this experiment, *G. resinaceum* polysaccharide extract (125 mg/kg) showed very strong anti-oedema activity 3 hours after injection of carrageenan.

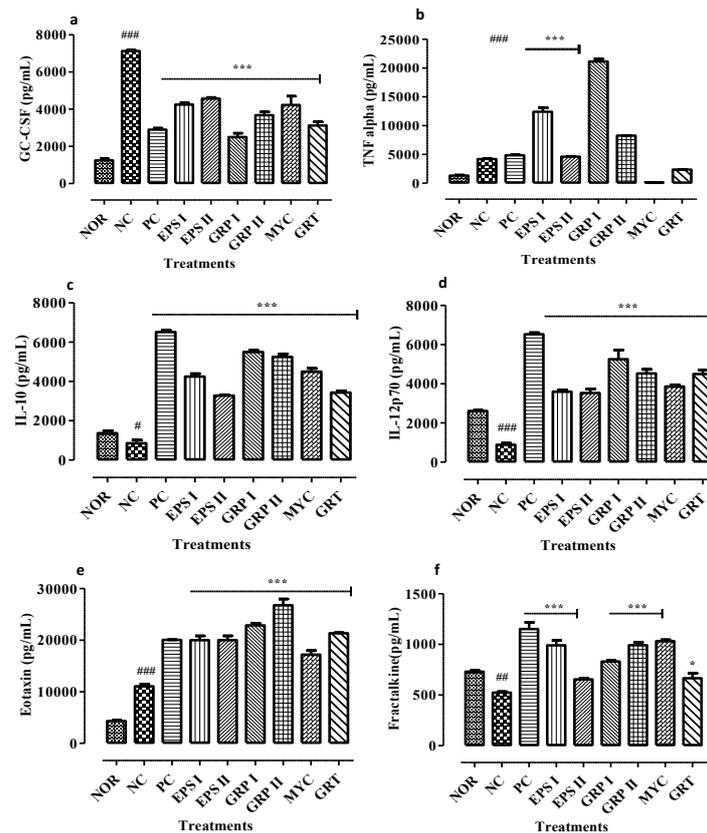


Figure 5. Effects of *G. resinaceum* extracts (125 mg/kg) or diclofenac sodium (20 mg/kg) on subcutaneous plantar tissue cytokines (G-CSF, TNF- α , IL-10, IL-12p70) and chemokines (eotaxin and fractalkine) levels in carrageenan induced paw oedema in Wistar rats. **(a) G-CSF:** Growth Colony Stimulating Factor; **(b) TNF- α :** Tumour Necrosis Factor alpha, **(c) IL-10:** Interleukin-10, **(d) IL-12p70:** Interleukin-12p70; **(e) Eotaxin;** (f) Cytokine/chemokine levels, which are represented as mean \pm SD (n = 5). ###P < 0.001 ##P < 0.01 compared to Normal group, #P < 0.05 compared to Normal group, *P < 0.05 compared to Negative Control, **P < 0.01 compared to Negative Control., ***P < 0.001 compared to Negative Control. **NOR:** Normal Control (Animals that received only 0.9% NaCl p.o); **NC:** Negative Control (Animals that received 100 μ L of 1% κ -carrageenan solution + 0.9% NaCl i.p); **PC:** Positive Control (Animals that received diclofenac sodium at 20 mg/kg + 0.9 % NaCl p.o); **EPS:** Animals that received the polysaccharide extracts EPS I and EPS II at a dose 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o; **GRP:** Animals that received the polysaccharide extracts GRP I and GRP II at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o; **MYC:** Animals that received the mycelial extract (MYC) at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o; **GRT:** Animals that received the crude extract of *G. resinaceum* (GRT) at a dose of 125 mg/kg + 0.9% NaCl p.o.

The histological data revealed that carrageenan induction caused acute inflammation characterized by oedema, which was reflected microscopically by pale, poor staining, and distended appearance of the connective tissue. In animals treated with *G. resinaceum* extracts, there was a decrease in the intensity of the infiltrate and a reduction in the size of the follicles corresponding to the repair phase, which results in new blood vessels on the surface of the lesions.

The late phase of acute inflammation is also marked by the production of proinflammatory cytokines and chemokines in serum and subcutaneous tissue. *G. resinaceum* extracts significantly decreased the levels of proinflammatory cytokines and chemokines and significantly increased the levels of anti-inflammatory cytokines compared to the negative control group. Several authors have highlighted the anti-inflammatory properties of bioactive compounds in medicinal plants. For example, diallyl disulfide, an organosulfur compound

isolated from garlic inhibits the development of oedema in mice by significantly reducing CRP, TNF- α , IL-1 β , and IL-2, and thus the infiltration and migration of macrophages and leukocytes to the site of injury (44). Betulinic acid significantly reduces serum levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, GM-CSF, KC, MCP-1, and PGE2 and increases those of IL 10 and IL-12 in mice (45). Vinpocetine significantly reduces inflammatory pain by regulating oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production through the NF κ -B pathway in mice (46). Pro-inflammatory cytokines (G-CSF, TNF- α , IL-1 β , IL-2, etc) are produced by immune (macrophages, monocytes) and non-immune (fibroblasts, endothelial cells) cells in response to tissue attack (47). TNF- α stimulates the secretion of G-CSF, IL-1 β , kinins, and leukotrienes that regulate and control nociception during the late phase. TNF- α is also involved in the regulation of other pro-inflammatory cytokines, expression of adhesion molecules on the surface of neutrophils, endothelial cells, activation and chemotaxis

of leukocytes (48). Chemotaxis of immune cells at the site of inflammation is mediated through chemokines such as eotaxin and fractalkine. Thus, in the test animals, the low level of eotaxin in the serum and subcutaneous tissue reflects a low infiltration of eosinophils at the site of inflammation. These cells are capable of producing ROS, pro-inflammatory cytokines, and granular proteins with high cytotoxic potential. Similarly, fractalkine is a chemoattractant of monocytes, T cells, and natural killers under the induction of proinflammatory cytokines (49,50). These anti-inflammatory activities are greater in the groups treated with GRP I and GRP II, suggesting that the polysaccharide fractions of *G. resinaceum* would exert their anti-inflammatory activities *in vivo* by inhibiting the synthesis and production of prostaglandins and lysosomal enzymes and by regulating the levels of cytokines and chemokines, thus preventing massive invasion of immune cells at the site of inflammation.

Conclusion

The aim of this study was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of *G. resinaceum* extracts. *G. resinaceum* polysaccharides exhibited antiradical, NO scavenging, and ferrous chelating ions activities at concentrations ranging from 25 to 200 µg/mL. It was also found that *G. resinaceum* polysaccharide extracts exhibited remarkable membrane protective effects on murine erythrocyte membranes and inhibit protein denaturation at concentrations of 100 to 500 µg/mL. Moreover, at a dose of 125 mg/kg, GRP I and GRP II inhibited the development of oedema induced by injection of carrageenan in the left hind paw of the animal. This anti-oedematous activity was confirmed by the restoration of the microarchitecture and a weak infiltration of immune cells in the subcutaneous tissues. Biochemically, GRP I and GRP II significantly inhibited the overproduction of proinflammatory cytokines (G-CSF, TNF-α), chemokines (eotaxin, fractalkine) and significantly increased the levels of anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-12p70). Therefore, *G. resinaceum* polysaccharide-rich fractions would be good candidates for the development of new therapies against oxidative- and inflammatory-related disorders.

Acknowledgements

The authors are kindly thankful to Dr Ayissi (Laboratory of Mycology of University of Yaoundé 1) for authentication of *G. resinaceum* strains and to M. TAKALA Jean Pierre (Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé 1) for his valuable assistance in the histological analysis.

Authors' contributions

MTKS and BT were involved in the conceptualization and design of the study, MTKS and MKF carried out experiments, interpreted the data, wrote the paper and revised the manuscript, and SNY and MA carried out

experiments. All authors approved the final version for publication.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Ethical considerations

The experimental protocol was approved by the Cameroon Institutional National Ethics Committee (Ref. number FWA-IRD 0001954). The handling of animals and experiments were performed with respect to the principles and procedures of the European Union Animal Care (CEE Council 86/609) guidelines adopted by the Cameroon Institutional National Ethics Committee.

Funding/Support

This study was self-funded by the authors.

References

- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-55. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776.
- Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1865-79. doi: 10.1089/ars.2006.8.1865.
- Flohé L, Brigelius-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(6):1115-26. doi: 10.1016/s0891-5849(96)00501-1.
- Dkhil MA, Kassab RB, Al-Quraisy S, Abdel-Daim MM, Zrieh R, Abdel Moneim AE. *Ziziphus spina-christi* (L.) leaf extract alleviates myocardial and renal dysfunction associated with sepsis in mice. *Biomed Pharmacother*. 2018;102:64-75. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.032.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Leelaprakash G, Dass SM. In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *Int J Drug Dev Res*. 2011;3(3):189-96.
- Vadivu R, Lakshmi KS. In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp *laurina*. *Bangladesh J Pharmacol*. 2008;3(2):121-4. doi: 10.3329/bjp.v3i2.956.
- Mansouri MT, Hemmati AA, Naghizadeh B, Mard SA, Rezaie A, Ghorbanzadeh B. A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. *Indian J Pharmacol*. 2015;47(3):292-8. doi: 10.4103/0253-7613.157127.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204-18. doi: 10.18632/oncotarget.23208.
- Emran TB, Nasir Uddin MM, Rahman MA, Hossain MI, Islam MM, Kabir MI. In vitro erythrocyte membrane stabilization properties of *Solanum aethiopicum* L. fruit extracts. *Bioresearch Communications-(BRC)*. 2015;1(2):111-5.

11. Boudjeko T, Ngomoyogoli JE, Woguia AL, Yanou NN. Partial characterization, antioxidative properties and hypolipidemic effects of oilseed cake of *Allanblackia floribunda* and *Jatropha curcas*. BMC Complement Altern Med. 2013;13:352. doi: 10.1186/1472-6882-13-352.
12. Mediesse KF, Sipping KMT, Kouamo MMF, Obadiah K, Tassi YS, Mbacham FW, et al. Polysaccharide fractions from *Khaya grandifoliola* stem bark and *Cryptolepis sanguinolenta* leaves: partial characterization, antioxidant and immunomodulatory effects. Afr J Biotechnol. 2018.
13. Xie JH, Jin ML, Morris GA, Zha XQ, Chen HQ, Yi Y, et al. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56 Suppl 1:S60-84. doi: 10.1080/10408398.2015.1069255.
14. Thangam R, Sathuvan M, Poongodi A, Suresh V, Pazhanichamy K, Sivasubramanian S, et al. Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by *Cymbopogon citratus* polysaccharide fractions. Carbohydr Polym. 2014;107:138-50. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.039.
15. Guissou KM, Sanon E, Sankara PH, Guinko S. La mycothérapie au Burkina Faso: État des lieux et perspectives. J Appl Biosci. 2014;79:6896-908. doi: 10.4314/jab.v79i1.14.
16. Oyetayo OV. Medicinal uses of mushrooms in Nigeria: towards full and sustainable exploitation. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2011;8(3):267-74. doi: 10.4314/ajtcam.v8i3.65289.
17. Paterson RR. Ganoderma - a therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry. 2006;67(18):1985-2001. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.07.004.
18. Wu Q, Yu J, Ying W, Su T, Cheng X, Zhao J, et al. Cultivation of the wild *Ganoderma gibbosum* mycelia via submerged liquid fermentation for inter/extra-cellular polysaccharides. Int J Agric Biol. 2018;20(5):1218-24.
19. Liu YH, Lin YS, Lin KL, Lu YL, Chen CH, Chien MY, et al. Effects of hot-water extracts from *Ganoderma lucidum* residues and solid-state fermentation residues on prebiotic and immune-stimulatory activities in vitro and the powdered residues used as broiler feed additives in vivo. Bot Stud. 2015;56(1):17. doi: 10.1186/s40529-015-0097-3.
20. Hua D, Zhang D, Huang B, Yi P, Yan C. Structural characterization and DPPH· radical scavenging activity of a polysaccharide from Guara fruits. Carbohydr Polym. 2014;103:143-7. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.009.
21. Kim HM, Kim SW, Hwang HJ, Park MK, Mahmoud YA, Choi JW, et al. Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. J Microbiol Biotechnol. 2006;16(8):1240-7.
22. Katalinić V, Milos M, Modun D, Musić I, Boban M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. Food Chem. 2004;86(4):593-600. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.10.007.
23. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26(9-10):1231-7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
24. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. Biochem Biophys Res Commun. 1994;201(2):748-55. doi: 10.1006/bbrc.1994.1764.
25. Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Arch Biochem Biophys. 1994;315(1):161-9. doi: 10.1006/abbi.1994.1485.
26. Mehta JP, Parmar PH, Vadia SH, Patel MK, Tripathi CB. In-vitro antioxidant and in-vivo anti-inflammatory activities of aerial parts of *Cassia* species. Arab J Chem. 2017;10:S1654-S62. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.06.010.
27. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc Soc Exp Biol Med. 1962;111(3):544-7. doi: 10.3181/00379727-111-27849.
28. Tinamri M. et Lagmi I. Optimisation des conditions d'extraction des polysaccharides issus d'Astragalus gombo bunge (Fabaceae) récolté au Sahara septentrional Est algérien. Mémoire de fin d'étude. 2014. 58p.
29. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. Free Radic Biol Med. 2013;60:1-4. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011.
30. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J. 2013;21(2):143-52. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.
31. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends Pharmacol Sci. 2005;26(4):190-5. doi: 10.1016/j.tips.2005.02.005.
32. Diouf PN, Stevanovic T, Boutin Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. Ind Crops Prod. 2009;30(2):297-303. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.05.008.
33. Shi M, Zhang Z, Yang Y. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). Carbohydr Polym. 2013;95(1):200-6. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.02.081.
34. Ibrahim AY, Mahmoud MG, Asker MM. Anti-inflammatory and antioxidant activities of polysaccharide from *Adansonia digitata*: an in vitro study. Int J Pharm Sci Rev Res. 2014;25(2):174-82.
35. Skyberg JA, Rollins MF, Holderness JS, Marlenee NL, Schepetkin IA, Goodyear A, et al. Nasal Acai polysaccharides potentiate innate immunity to protect against pulmonary *Francisella tularensis* and *Burkholderia pseudomallei* infections. PLoS Pathog. 2012;8(3):e1002587. doi: 10.1371/journal.ppat.1002587.
36. Boudjeko T, Megnekou R, Woguia AL, Kegne FM, Ngomoyogoli JE, Tchoumou CD, et al. Antioxidant and immunomodulatory properties of polysaccharides from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L.) King and H.E. Robins leaves. BMC Res Notes. 2015;8:759. doi: 10.1186/s13104-015-1703-x.
37. Mohan K, Padmanaban M, Uthayakumar V. Isolation, structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (higher basidiomycetes). Am J Biol Life Sci. 2015;3(5):168-75.
38. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:5698931. doi:

- 10.1155/2016/5698931.
39. Varghese CP, Ambrose C, Jin SC, Lim YJ, Keisaban T. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Eurycoma longifolia* Jack, a traditional medicinal plant in Malaysia. *Int J Pharm Sci Nanotechnol.* 2013;5(4):1875-8.
 40. Anosike CA, Obidoa O, Ezeanyika LU. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *Daru.* 2012;20(1):76. doi: 10.1186/2008-2231-20-76.
 41. Arya D, Patni V. Comparative analysis of in vitro anti-inflammatory and anti-arthritis activity in methanolic extract of *Pluchea lanceolata* Oliver & Hiern. in vivo and in vitro. *Int J Biol Pharm Res.* 2013;4(9):676-80.
 42. Tangara MS. Essais sur un Médicament Traditionnel Amélioré à base des calices de *Hibiscus sabdariffa* utilisé contre l'hypertension artérielle: formulation et dénomination commerciale [dissertation]. Bamako: Thèse de Pharmacie, USST de Bamako; 2012. p. 130.
 43. Florentino IF, Silva DPB, Silva DM, Cardoso CS, Moreira ALE, Borges CL, et al. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: the role of nitric oxide. *Nitric Oxide.* 2017;69:35-44. doi: 10.1016/j.niox.2017.04.006.
 44. Zhang H, Shang C, Tian Z, Amin HK, Kassab RB, Abdel Moneim AE, et al. Diallyl disulfide suppresses inflammatory and oxidative machineries following carrageenan injection-induced paw edema in mice. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:8508906. doi: 10.1155/2020/8508906.
 45. Ou Z, Zhao J, Zhu L, Huang L, Ma Y, Ma C, et al. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomed Pharmacother.* 2019;118:109347. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109347.
 46. Ruiz-Miyazawa KW, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Pavão-de-Souza GF, Casagrande R, Verri WA Jr. Vinpocetine reduces carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in mice by inhibiting oxidative stress, cytokine production and NF- κ B activation in the paw and spinal cord. *PLoS One.* 2015;10(3):e0118942. doi: 10.1371/journal.pone.0118942.
 47. Copray JC, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Küst BM, Liem RS, et al. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol.* 2001;118(2):203-11. doi: 10.1016/s0165-5728(01)00324-1.
 48. Cha DS, Eun JS, Jeon H. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. *J Ethnopharmacol.* 2011;134(2):305-12. doi: 10.1016/j.jep.2010.12.017.
 49. Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song HS, Sawamura M, Suganuma N. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos* Tanaka) essential oil on eosinophils. *J Food Sci.* 2010;75(3):H87-92. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01541.x.
 50. Jones B, Koch AE, Ahmed S. Pathological role of fractalkine/CX3CL1 in rheumatic diseases: a unique chemokine with multiple functions. *Front Immunol.* 2011;2:82. doi: 10.3389/fimmu.2011.00082.