

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Pharmacie Industrielle

**Effet préventif et thérapeutique d'un
extrait végétal dans un modèle in vivo de
la maladie inflammatoire de l'intestin.**

Présenté par :

M^{lle} Stambouli Hadjer.

M^{lle} Bouchemit Raouda.

Encadré par :

M^{me}.LARIBI.H

Co-encadré par :

M^{me}.BELKADI.A

Année universitaire 2019/2020

Résumé :

Les polyphénols suscitent un intérêt croissant dans le domaine de la santé digestive. En effet ils sont faiblement absorbés au niveau de l'intestin grêle et sont présents en quantité relativement importante dans le colon, leurs métabolites pourraient donc exercer des effets bénéfiques à ce niveau.

Une biomasse végétale marc de raisin riche en composés phénoliques, a été choisie afin d'évaluer son pouvoir anti-inflammatoire *in vivo*. La présente étude a montré que l'extrait phénolique de la pellicule du marc de raisin une quantité importante de ces composés (102.4 mg EAG/g de MS). L'activité anti-inflammatoire évaluée avec l'acide acétique a montré une amélioration générale de l'état clinique des souris traitées, une réduction significative de DAI et du rapport P/L du colon pour les deux différentes doses de l'extrait en comparaison avec un médicament de référence (sulfasalazine). Ainsi qu'une préservation remarquable de l'intégrité de l'épithélium intestinale chez les souris traitées avec l'extrait phénolique.

Mots clés : composés phénolique, marc de raisin, inflammation intestinale, activité anti inflammatoire, rectocolite.

Abstract:

Polyphenols are attracting growing interest in the field of digestive health. Indeed, they are poorly absorbed in the small intestine and are present in relatively large quantities in the colon; their metabolites could therefore have beneficial effects at this level.

A plant biomass of grape pomace, rich in phenolic compounds, was chosen to evaluate its anti-inflammatory power *in vivo*. The present study showed that the phenolic extract of the grape pomace skin contained a significant amount of these compounds (102.4 mg EAG/g MS). The anti-inflammatory activity evaluated with acetic acid showed an overall improvement in the clinical condition of the treated mice, a significant reduction in DAI and in the P/L ratio of the colon for the two different doses of the extract compared to a reference drug (sulfasalazine). As well as a remarkable preservation of the integrity of the intestinal epithelium in the mice treated with the phenolic extract.

Keywords: Intestinal inflammation, anti-inflammatory, activity colitis, phenolic compound, grape marc.

ملخص

تجذب البوليفينول اهتمامًا متزايدًا بصحة الجهاز الهضمي. في الواقع ، يتم امتصاصها بشكل سيئ من الأمعاء الدقيقة وتوجد بكميات كبيرة نسبيًا في القولون ، وبالتالي يمكن أن تؤدي نواتجها الأيضية إلى تأثيرات مفيدة على هذا المستوى. تم اختيار الكتلة الحيوية لنبات ثفل العنب الغنية بالمركبات الفينولية من أجل تقييم قوتها المضادة للالتهابات في الجسم الحي. أظهرت الدراسة الحالية أن المستخلص جم / EAG الفينولي لبشرة ثفل العنب يحتوي على كمية معنوية من هذه المركبات (102.4 مجم وقد أظهر النشاط المضاد للالتهابات الذي تم تقييمه باستخدام حمض الأسيتيك تحسناً عاماً. (DM وفي نسبة في القولون لجرعتين DAI للحالة السريرية للفئران المعالجة ، انخفاض كبير في بالإضافة إلى (sulfasalasin) الوزن/الطول مختلفتين من المستخلص مقارنة بالعقار المرجعي الحفاظ بشكل ملحوظ على سلامة ظهارة الأمعاء في الفئران المعالجة بالمستخلص الفينولي.

الكلمات المفتاحية:

القولون, الالتهاب المعوي, المركبات الفينولية ,ورق العنب,نشاط مضاد للالتهابات .

Remerciement

Nous remercions tout d'abord Dieu, le tout puissant de nous avoir accordé santé, courage et foi.

NOUS tenons à remercier notre promotrice, Madame LARIBI H, Professeur à l'Université de Blida 1, Département de Génie des Procédés, pour nous avoir encadré, pour sa patience, sa constante disponibilité, ses précieux conseils et l'intérêt qu'elle a témoigné pour suivre ce travail.

Nous tenons à exprimer nos profonde gratitude au Dr.BELKADI pour son encadrement sa patience ses précieuses conseils, sa disponibilité a tout épreuves, nous lui sommes très reconnaissantes d'avoir mis toutes sa compétence à notre disposition merci madame vous êtes très gentille.

Nous remercions l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

On tient à remercier sincèrement Melle SAADOUNE Zineb pour son aide précieuse, sa disponibilité, ses conseils et sa gentillesse.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'équipe du centre de recherche et de développement surtout ammi moussa pour son aide.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation tout au long de notre chemin d'étude.

Un très grand merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études et la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents, les prunelles de mes yeux, à qui je dois tous, et pour qui aucune dédicace ne saurait exprimer mon profond amour, ma gratitude, ni ma forte reconnaissance pour l'ampleur des sacrifices et des souffrances qu'ont enduré pour mon éducation, pour mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

Vos prières et votre présence à mes cotés ont été pour moi un grand soutien moral tout au long de ma vie, j'espère réaliser en ce jour un de vos rêves, et être digne de votre confiance. Puisse dieu, le tout puissant, vous protéger, vous accorder santé et longue vie, afin que je puisse vous rendre un minimum de ce que je vous dois et faire en sorte que jamais je ne vous déçois.

A mes chers frères Billel, Mohamed et Samir je vous remerciez pour toute l'affection et la sécurité que vous m'avez toujours entouré.

A mes belles sœurs Houba, Hadjer et Meriem je vous remercie pour vos encouragements et je vous souhaite bonheur santé et prospérité.

A ma sœur du cœur Hiba, mon amie d'enfance et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin, un énorme merci pour tes conseils, tes encouragements, ton aide.

A mon âme sœur Rania, ma confidente, ma meilleure qui me soutien dans tous les hauts et qui m'épaulés dans les bas, tu es toujours été l'épaule solide, l'oreille attentive et compréhensive.

A mon chère amie Ahlem, mon amie d'enfance et de collège, je te souhaite beaucoup de bonheur et réussite.

A mon chère amie et binôme Raouda merci pour ton soutien, ta compréhension, et ta patience.

A mon fiancé, merci pour ton soutien et tes encouragements.

A tous que je n'ai pas cité mais existent au fond du mon cœur et de ma pensée.

HADJER

Je dédie ce présent travail premièrement et avant tout aux deux êtres les plus chers sur cette terre, mes parents qui n'ont jamais cessé de me soutenir tout au long de mes études.

Je vous remercie pour tout l'amour que j'ai ressentie, pour tout les sacrifices que vous avez consentiez pour mes études et mon bien-être. Merci d'être des parents juste parfait.

Puisse Dieu, le Très Haut, Vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes chères sœurs Lilia et Bouchra pour leurs encouragement et leurs soutien et poussés à continuer mes études pendant mes années d'études.

A mes frères Mohamed et Mahdi.

A mes grands frères Samir et Mouloud.

A tous mes amies les plus proches qui m'ont apporté leur soutien pendant ces années, et avec les quelles j'ai pu partager des moments de bonheur uniques: Houda, Abir, Hadjer et Ibtissem vous êtes mes sœurs du cœur.

*A ma grand-mère Que Dieu, le tout puissant, te garde pour nous
A mes tentes Sousou, Loubna.*

A mes chers oncles riadh, noureddine je suis très reconnaissante.

A mes chères cousines rym, lina je vous souhaite tout le bonheur.

A mon binôme Hadjer merci pour ton soutien, ta patience et ton encouragement.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer mais que je n'ai pas oublié et à tous ceux qui feront partie de ma vie...

Raouda

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATION

INTRODUCTION

CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUES

I.	LES POLYPHENOLS	3
I.1.	Généralité sur les polyphénols:	3
I.2.	Structure et classification des composés phénoliques:	3
I.2.1.	Composés flavonoïdes :.....	3
I.2.2.	Composés non flavonoïdes :.....	6
I.3.	Marc de raisin :	7
I.3.1.	La grappe de raisin :	8
I.3.2.	Le grain de raisin:	8
I.4.	Les polyphénols de raisin :	9
I.5.	Extraction des composés phénoliques:	10
I.5.1.	Extraction par solvant:.....	10
I.5.2.	Procédés innovants d'intensification de l'extraction:	11
I.5.2.1.	Les ultrasons :.....	11
I.5.2.2.	Les micro-ondes :	12
I.5.2.3.	Les champs électriques pulsés – CEP :.....	12
I.5.2.4.	Les décharges électriques de hautes tensions – DEHT :	13
I.6.	Avantages et inconvénients des méthodes innovantes:	13
I.7.	Application des polyphénols :.....	15
II.	INFLAMMATION INTESTINALE.....	16
II.1.	Définition de l'inflammation intestinale:	16
II.2.	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :	17
II.2.1.	La maladie de Crohn :	17
II.2.2.	La recto-colite-hémorragique :	18

II.3.	Les causes d'une inflammation des intestins :	18
II.4.	Traitements pour l'inflammation intestinale:	19
II.5.	Biodisponibilité des polyphénols	20
II.6.	L'absorption des polyphénols	20
II.6.1.	Absorption au sein de l'estomac:	20
II.6.2.	Absorption à partir de l'intestin grêle:	20
II.6.3.	Absorption à partir du côlon:	21
II.7.	Mécanisme des polyphénols :	21

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

I.	MATERIELS	23
II.	METHODES	25
II.1.	Préparation de l'extrait :	25
II.2.	Analyses phytochimiques d'extrait phénolique :	26
	Dosage des polyphénols totaux :	26
II.3.	Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC:	26
	Condition opératoires de l'analyse par HPLC:	27
II.4.	Etude in vivo de l'inflammation intestinale :	28
II.4.1.	Induction de la colite ulcéreuse:	28
II.4.2.	Traitement :	29
II.4.3.	Observations générales et score clinique	30
II.4.4.	Score macroscopique	31
II.4.5.	Sacrifice et prélèvement des organes:	31

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

I.	CARACTERISTIQUES DE L'EXTRAIT PHENOLIQUE	33
I.1.	La teneur des polyphénols :	33
I.2.	Analyse par chromatographie liquide a haute performance :	34
II.	ANALYSES CLINIQUES :	35
II.1.	L'évolution pondérale des souris :	35
II.2.	Evaluation de l'indice d'activité de la maladie:	36
II.3.	Evaluation macroscopique de la colite:	39
II.4.	L'évolution pondérale et la longueur du côlon :	41

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Squelette de base des flavonoïdes	4
Figure I.2 : Structures chimiques de flavonols.	5
Figure I.3: Structure générale d'une grappe de raisin	8
Figure I.4 : Structure d'un grain de raisin	9
Figure I.6: Différents segments du tube digestif peuvent être atteints en cas de RCH et MC, allant du rectum à l'ensemble du côlon. Illustration réalisée grâce à ServierMedical Art..	17
Figure I.7: Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCUH ..	18
Figure II.1 : Structure chimique de la sulfasalazine.....	23
Figure II.2 : les souris albinos dans une cage polystyrène.	24
Figure II.3: la pellicule broyée du marc de raisin.	25
Figure II.4 : Bain ultrason.....	25
Figure II.5 : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance.	27
Figure II.6 : Injection de l'acide acétique (Injection rectale).....	29
Figure II.7 : Administration par gavage.	30
Figure II.8: Sacrifice des animaux.	32
Figure II.9:Extraction du côlon de l'abdomen de souris.....	32
Figure III.1: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	33
Figure III.2: Chromatogramme HPLC de l'extrait obtenu de la pellicule de baie de raisin.	34
Figure III.3: Evolution du poids des souris traités par les différentes doses de l'extrait phénolique.....	35
Figure III.4.Score de la consistance selles des souris.....	37
Figure III.5.Score des saignements dans les différents lots.....	37
Figure III.6:Évaluation de l'indice d'activité de la maladie des différents lots.	39
Figure III.7: Morphologie des colons après traitement	40
Figure III.8 : le rapport poids / Longueur des différents lots.....	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Avantages et inconvénients des nouvelles méthodes d'intensification de l'extraction.	14
Tableau II.1 : Identification chimiques et propriétés de la sulfasalazine.	24

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Acide acétique (CH_3COOH)

CEP : Champ électrique pulsés

DAI : Indice de la maladie

DEHT : Les décharges électriques de hautes tensions

DIC : La détente instantanée contrôlée

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

MC : Maladie de Crohn

MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin

mg EAG/g MS: milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PA : Principe actif

RCH : Rectocolite hémorragique

RCUH : Rectocolite ulcéro- hémorragique

T : Témoin

TNF α : Facteur de nécrose tumoral

US : Ultrason

UV : Rayonnement ultraviolet

INTRODUCTION GENERALE

La réaction inflammatoire est une réponse locale mise en place à la suite d'une lésion ou d'une infection tissulaire. Elle se déroule en trois étapes principales : une augmentation de l'apport sanguin sur le site de l'infection favorisant la migration des leucocytes et des protéines sériques, une augmentation de la perméabilité capillaire favorisant l'exsudation des protéines sériques (anticorps, complément, kininogènes) et une augmentation de la migration leucocytaire dans le tissu [1].

La rectocolite est une affection inflammatoire qui évolue par poussées survenant après des périodes de rémission plus ou moins longues [2]. Elle se caractérise cliniquement par des ulcérations chroniques récurrentes et superficielles de la muqueuse qui affecte de manière continue et homogène les parties inférieures du tube digestif [3], le traitement chimique engendrent des effets indésirables et des complications plus ou moins sévères à long terme [4]. Pour cela, la recherche des biomolécules naturelles qui ont moins d'effets indésirables que les médicaments mais dotés du même effet thérapeutique est la préoccupation des chercheurs. Les composés phénoliques des plantes ont été signalés à être bénéfiques dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques [5]. De nombreuses études ont montré que les plantes possèdent une activité inhibitrice des enzymes COX. Ces plantes peuvent donc être une solution dans le traitement des douleurs et des maladies inflammatoires [5]. C'est pourquoi nous nous sommes intéressées aux composés phénoliques extraits du marc de raisin

Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérigène, anti-inflammatoire, antioxydant etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentant ainsi des propriétés anti oxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant) [6].

En effet, les polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'intestin grêle et sont présents en quantité relativement importante dans le côlon. Des études expérimentales récentes suggèrent que les polyphénols pourraient aider à prévenir ou retarder la progression de l'inflammation colique.

Plusieurs études ont montré que les polyphénols pourraient moduler l'inflammation intestinale et c'est la raison pour laquelle nous nous sommes attelées à tester l'effet curatif des extraits du marc de raisin riche en polyphénols sur la rectocolite ulcéro-hémorragique induite sur un modèle animal.

Dans cette étude nous nous sommes intéressées à savoir l'effet l'extrait phénolique du marc de raisin sur l'inflammation intestinale. Pour cela, notre étude est divisée en trois chapitres : le premier chapitre de ce manuscrit constitue une étude bibliographique. Le second expose les procédés expérimentaux, suivi des résultats obtenus et de leur discussion.

CHAPITRE I :

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES POLYPHENOLS

I.1. Généralité sur les polyphénols:

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure [1]. Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné. On distingue les acides phénoliques (C6-C1 et C6-C3), les flavonoïdes (C6-C3-C6), les lignanes (C6-C3-C3-C6) et les stilbènes (C6-C2-C6). Les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces.

I.2. Structure et classification des composés phénoliques:

De nombreuses molécules de diverses structures rentrent dans la composition des polyphénols. Actuellement dans la botanique, on est parvenu à identifier et à isoler plus de 8000 composés phénoliques, ceux-ci sont répartis en différentes classes qui elles-mêmes peuvent être divisées en deux classes suivant la structure chimique du composé les composés non flavonoïdes et les composés flavonoïdes.

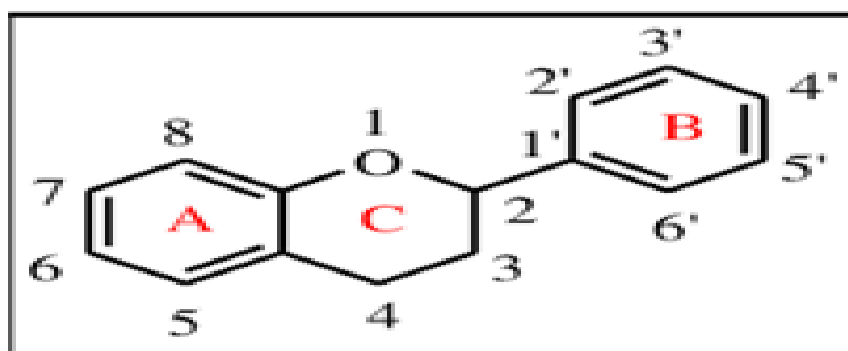
I.2.1. Composés flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6(FigureI.1) [7].

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [8]. Les flavonoïdes sont

présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides [9].



FigureI.1 : Squelette de base des flavonoïdes [8].

Les flavonoïdes sont des molécules qui protègent les plantes. Parmi elles, on peut citer la catéchine et ses dérivés qui ont des vertus antimicrobiennes, ainsi que l'apigénine qui protège contre les termites et les bactéries [10]. Les flavonoïdes sont utilisés dans plusieurs domaines (médical, nutritionnel, cosmétique, pharmacologique etc.) pour leurs différents bienfaits attribués à la diversité des molécules appartenant à cette famille. En effet, selon la structure chimique de leur molécule, les flavonoïdes peuvent être classifiés dans différentes sous classes : flavonoles, flavanonoles, flavanols, flavones, flavanones, anthocyanes, isoflavonoïdes. Cette classification se fait par rapport à la structure de l'hétérocycle central et de son degré d'oxydation et d'insaturation. Ce qui fait la différence entre les molécules d'une même classe est le nombre, la nature et la position des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les cycles C6.

a) **Les flavonoles**

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison en C2-C3 (FigureI.2). Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses: D-glucose et L-rhamnose[8]. Leurs principaux représentants sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière

fraiche) [11] [12], le poireau, le chou et les baies telles que le cassis (115 mg/kg de matière fraîche) [13]. Le thé contient aussi des flavonols à hauteur de 45 mg/L [14].

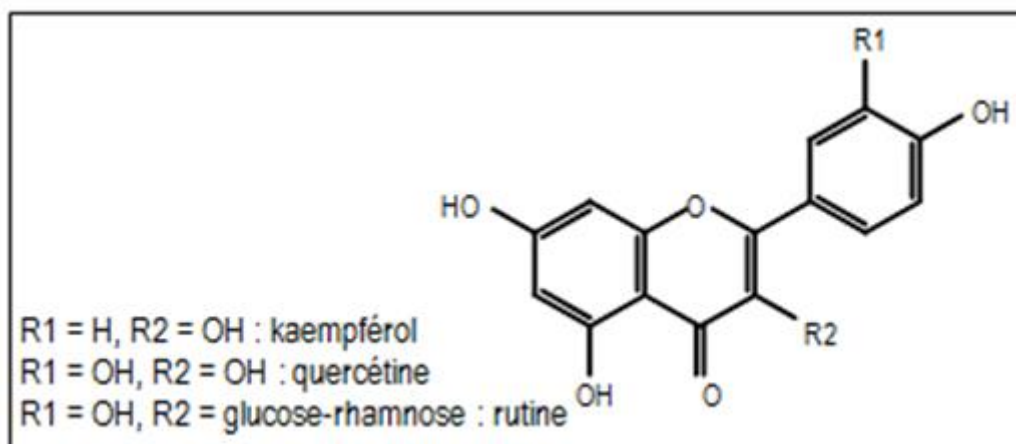


Figure I.2 : Structures chimiques de flavonols [8].

b) Les flavanols ou les flavan-3-ol :

Les flavanols existent sous forme de monomères et sous une forme plus ou moins polymérisée appelée les proanthocyanidines (tannins condensés ou tannins catéchiques). L'unité la plus simple des monomères est la catéchine mais on retrouve également d'autres molécules telles que l'épicatéchine gallate et l'épicatéchine. En ce qui concerne les tannins condensés, ce sont des polymères flavaniques constitués d'oligomères de catéchine et d'épicatéchine, ce qui justifie leur classification comme flavonoïdes au sens large. Ces tannins condensés sont très présents dans les tissus forestiers de nombreuses essences tels que l'acacia ou l'écorce de pin. Leur poids moléculaire est estimé entre 500 et 20 000 Da [15]. De plus, ils font l'objet de nombreuses études et se révèlent être une source intéressante sur le plan chimique pour la préparation d'adhésifs à partir de bois.

c) Les anthocyanes :

Les anthocyanes sont des pigments naturellement colorés et hydrophiles qui donnent ces couleurs allant du rose au violet aux végétaux. Leur structure est basée sur un noyau « flavanoïde » de charge positive. Cette sous-classe regroupe des molécules qui se distinguent les unes des autres par leur degré d'hydroxylation et de méthylation mais aussi par les sucres (glucose, galactose, rhamnose ou arabinose) liés à la molécule notamment [15]. A l'état libre, ces composés sont chimiquement instables et en fonction des propriétés physico-chimiques du milieu d'extraction (pH, présence de SO₂,...), ils sont susceptibles

de perdre leur couleur. Les anthocyanes ont de larges possibilités de valorisation dans le domaine industriel grâce à leur capacité anti-oxydante et à leur importante activité biologique.

d) **Les flavanones** :

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2 [16] [17].

Les flavanones sont des composés que l'on retrouve dans les fruits et légumes (tomate, menthe, citron, etc.). On retrouve parmi leurs caractéristiques des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anticancéreuses. Dans cette classe de polyphénols, on trouve des molécules comme la naringénine, l'héspéridine et l'ériodictyol [18].

e) **Les flavones** :

Parmi toutes les sous-classes des flavonoïdes, les flavones est la moins abondante chez les végétaux. Ces composés sont essentiellement présents dans le persil, le thym ou encore le céleri. On retrouve dans cette sous-classe des molécules comme la lutéoline, l'apigénine et la chrysine.

f) **Les flavanonoles** :

Les flavanonoles sont présents sous forme d'hétérosides dans les tissus des végétaux. Quelques-unes des molécules de cette sous-classe ont déjà été extraites des écorces des plantes, on cite à titre d'exemple la taxifoline et l'aromadédrine [15].

g) **Les isoflavonoïdes** :

Les isoflavones et les coumestans font partie des isoflavonoïdes. On les retrouve dans les légumes ou le soja (principale source d'isoflavones ou très riche en isoflavones)

I.2.2. Composés non flavonoïdes :

Les composés non flavonoïdes sont divisés en quatre sous classes : les acides phénoliques, les stilbènes, les tannins hydrolysables et les lignanes.

a) **Les lignanes** :

Les lignanes sont des composés basés sur deux unités phénylpropane qui sont réunies par des liaisons résultant de couplages oxydatifs [15]. Parmi les particularités de ces composés on cite leurs effets antifongiques, antioxydants ainsi que leurs effets phytoestrogènes, ils sont présents dans les fruits, légumes et céréales mais aussi dans les tissus forestiers comme les nœuds de certains résineux [15].

b) **Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont classifiés selon deux groupes :

- Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque avec un squelette de base de type C6-C1. On retrouve de nombreuses molécules parmi ce groupe dans les écorces telles que l'acide gallique, l'acide salicylique, l'acide vanillique et l'acide syringique.
- Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques et ils présentent un squelette carboné de type C6-C3. Ils dérivent de l'acide cinnamique et on retrouve parmi cette famille les composés suivants : acides p-coumarique, férulique, caféique et sinapique.

c) **Les stilbènes** :

Les stilbènes contiennent deux noyaux aromatiques réunis par un pont méthylène (C6-C2-C6). Il existe divers composés basés sur cette structure assez simple, mais que l'on différencie par la position et le nombre de groupements hydroxyles, la substitution par des sucres ou des résidus méthoxy ainsi que par la conformation stérique (-cis et -trans) de la molécule. Environ 30 stilbènes et glycosides de stilbènes sont produits dans le règne végétal pour répondre aux attaques fongiques, bactériennes ou virales [15].

d) **Les tannins hydrolysables** :

Les tannins hydrolysables sont des esters d'acides phénoliques (acide gallique ou ellagique associés à un polyol (habituellement le glucose) [15]. Ce sont des composés macromoléculaires dont la masse moléculaire peut atteindre 20000 Da et qui sont solubles dans l'eau [15]. Ils peuvent être classifiés dans deux sous-groupes : les ellagitannins et les gallotannins.

I.3. Marc de raisin :

Le marc de raisin est le sous-produit obtenu lors de la fabrication du vin et du jus de raisin. Il constitue un ensemble de résidus (pellicules, pépins et éventuellement rafle) du raisin que l'on a pressé pour en extraire le jus. Qui peuvent avoir différentes utilisations, notamment en phytothérapie. Il concentre en effet de nombreux principes actifs du raisin dont une grande variété de polyphénols, des composés réputés pour leur puissant pouvoir antioxydant [18].

I.3.1. La grappe de raisin :

La grappe entière est portée par ce que nous appelons le sarment (Figure I.3). Elle est constituée par la rafle, partie ligneuse ramifiée reliant la grappe au sarment, supportant les grains et représentant 3 à 6% du poids de la grappe [19].

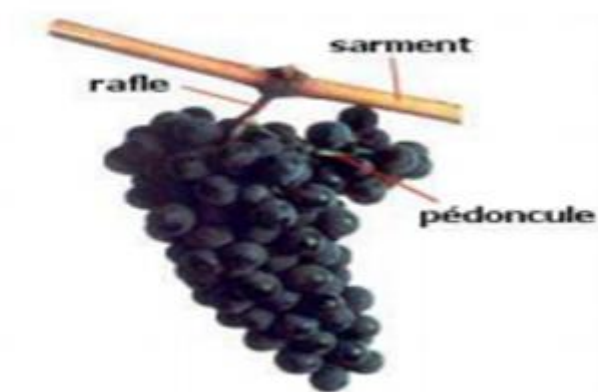


Figure I.3: Structure générale d'une grappe de raisin [19].

I.3.2. Le grain de raisin:

Il est globuleux, aplati, allongé, ovale ou ellipsoïde suivant les variétés. Il est porté par le Pédicelle, ce dernier se terminant par un bourrelet permettant l'insertion du grain. Ce qui enveloppe la baie se nomme pellicule ou peau et elle est recouverte de pruine ce qui la rend mouillable et lui permet de retenir les levures qui interviennent lors de la fermentation. Une grappe de raisin est formée de plusieurs petites grappes que l'on nomme grappillons. Chaque grappillon est formé de plusieurs grains qui sont eux, portés par une queue.

La peau d'un grain de raisin est mince. Elle enveloppe la pulpe. Les pépins de raisin sont durs et bruns. Lorsque l'on enterre un pépin, son germe se développe et donne un pied de vigne (Figure I.4)

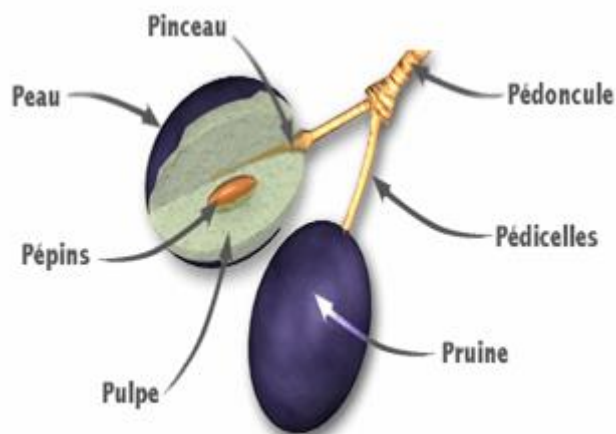


Figure I.4 : Structure d'un grain de raisin [20]

A l'intérieur du grain se trouve la chair ou pulpe, dont les cellules renferment le moût ou jus de raisin. Elle représente 80 à 85% du poids de la grappe. Dans la pulpe sont répartis les graines ou « pépins » constitués chacun par un petit embryon, lui-même entouré par un albumen et le tout protégé par un tégument. Dans chaque grain se trouve en général 3 à 4 graines. Certaines variétés sont apyrènes c'est à dire qu'elles n'ont pas de pépins (recherchées pour la production de raisins secs) [21].

I.4. Les polyphénols de raisin :

Chaque partie du raisin (pellicule pulpe et Pépin) a une composition qualitative (Figure I.5) et quantitative en polyphénol différent. La nature et la concentration de ces composés varient selon l'origine géographique du raisin, le cépage, la composition du sol, le climat, les pratiques de culture... [22]. La quantité de composés phénoliques totaux dans les différentes parties de la baie de raisin rouge a été estimée à environ 33 % dans les pellicules, 62 % dans les pépins, 1 % dans la pulpe et 4 % dans le jus [22]. Les composées phénoliques présentes dans les raisins sont principalement des flavonoïdes (anthocyanes, flavonol et pro anthocyanidines) et des acides phénoliques.

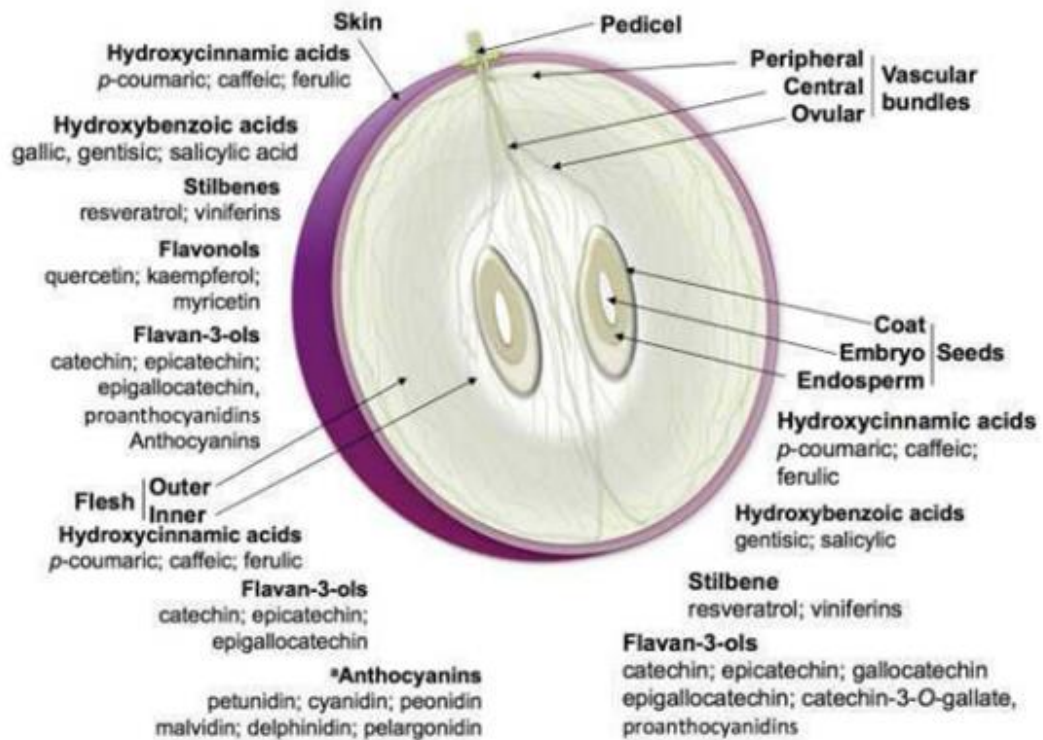


Figure I.5 : Composition qualitative en polyphénols dans le raisin [22].

I.5. Extraction des composés phénoliques:

L'extraction des composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques. De cette étude, il ressort que la macération par l'éthanol et par l'acétone sont les meilleures techniques d'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes alors que la décoction aqueuse est préférable pour l'extraction des tanins condensés.

I.5.1. Extraction par solvant:

L'isolement des principes actifs en général (composés phénoliques, colorants...) à partir des cellules est réalisé en faisant appel à l'extraction solide-liquide [23]. Parmi les nombreuses techniques d'extraction, l'extraction par solvant est la méthode la plus ancienne et également la plus utilisée. Dans la forme la plus simple de ce procédé, la matière à extraire et le solvant sont bien mélangés. Ensuite, une série de processus successifs a lieu traduisant l'interaction entre le solide et le solvant [24] :

- transfert du solvant du milieu environnant vers la surface externe du solide,
- la diffusion du solvant au sein de la matrice solide,
- la dissolution du soluté dans le solvant,
- la diffusion du soluté dissous dans le solvant de la matrice solide vers la surface,
- le transfert par convection ou diffusion du soluté vers la masse restante du solvant.

Bonilla, et al. ont trouvé que le taux d'extraction des composés phénoliques à partir de marcs de raisin est significativement influencé par la taille de la matière première. La fragmentation (ou broyage) d'un produit améliore le transfert de matière en augmentant la surface de contact entre solvant et solide [25]. Au niveau industriel, ce procédé pourrait être à la base d'une technique prometteuse pour l'extraction de molécules bioactives de plantes ou de sous-produits comme ceux issus des industries viticoles ou de jus de raisin [26].

I.5.2. Procédés innovants d'intensification de l'extraction:

L'extraction des polyphénols à partir des écorces à l'aide des techniques conventionnelles est une étape qui nécessite des durées d'extraction très longues et une consommation importante de solvant et d'énergie. Afin de réduire ces facteurs, les techniques conventionnelles se sont vues assistées par de nouvelles méthodes d'intensification telles que les ultrasons, les microondes, l'extraction par fluide supercritique, les hautes-pressions, l'extrusion, la détente instantanée contrôlée (DIC), les champs électriques pulsés et les décharges électriques de haute tension. Ces techniques d'intensification agissent selon différents mécanismes sur les membranes et/ou parois cellulaires et elles facilitent ainsi l'extraction des composés phénoliques dans le milieu environnant.

I.5.2.1. Les ultrasons :

Les ultrasons sont une technique développée à l'échelle industrielle et sont largement utilisés dans le traitement des polluants de l'eau, le séchage, le dégazage et l'élimination de la mousse, le découpage, la production d'émulsions, l'inactivation des spores, enzymes et microorganismes, etc. Les ultrasons sont des ondes ultrasonores qui génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. Ils sont classés en deux catégories selon la gamme de fréquence utilisée. En effet, lorsque la fréquence des ultrasons est élevée (2 à 10 MHz) et que la puissance est faible, on parle d'ultrasons de

diagnostic. On parle d'ultrasons de puissance lorsque la fréquence est faible (20 à 500 kHz) et que la puissance est élevée. Les applications des ultrasons de diagnostic sont différentes des applications des ultrasons de puissance [15]. Généralement, les ultrasons de diagnostic sont utilisés dans le domaine médical alors que les ultrasons de puissance trouvent des applications dans l'extraction [15].

I.5.2.2. Les micro-ondes :

Les micro-ondes sont une technologie mature aujourd'hui. En effet, la première utilisation s'est faite en 1950 après le dépôt d'un brevet par la société Raytheon suite à la découverte en 1945 des micro-ondes grâce au physicien Percy Spencer. A cette date, le four était destiné à faire cuire les aliments et il a été commercialisé en 1953. C'est seulement en 1986, que des recherches ont été entreprises pour l'utilisation des micro-ondes pour l'extraction [15]. Aujourd'hui, cette technologie est utilisée que ce soit à titre professionnel (laboratoire et industrie pour la pasteurisation, séchage, etc.) et à titre personnel (four à microondes pour la décongélation et la cuisson). Dans le domaine de l'extraction des composés phénoliques, de nombreuses études scientifiques ont démontré l'efficacité des micro-ondes pour extraire en un temps très court, des teneurs en composés qui sont élevées à partir de diverses matières premières [15].

I.5.2.3. Les champs électriques pulsés – CEP :

Le traitement par champs électriques pulsés est une technologie innovante qui a deux applications majeures ; inactivation et réduction des bactéries et des spores dans le but de préserver la qualité des aliments et l'extraction solide-liquide de différents composés à partir de plusieurs végétaux (fruits, légumes, coproduits de l'industrie alimentaire) [15]. La première utilisation de ce traitement électrique, dans l'industrie agroalimentaire, remonte aux années 20 avec la mise en œuvre d'un procédé de chauffage ohmic pour la pasteurisation du lait aux Etats-Unis (Procédé Electropure) [15]. Les premiers essais pilotes ont suivi dans les années 1990 en Allemagne. Ces essais ont été mis au point afin de maintenir la charge microbienne des liquides alimentaires à des niveaux acceptables avec le procédé Elsteril et dans le but d'extraire la matière grasse de poissons avec le procédé Elcrack. Aujourd'hui, on retrouve de nombreuses études scientifiques sur l'intensification de l'extraction des composés d'intérêt à partir de la biomasse [15] et à l'échelle industrielle, les champs électriques pulsés sont utilisés pour améliorer l'extraction de la teneur en composés phénoliques avec le développement du système KEA-Wein (Allemagne).

I.5.2.4. Les décharges électriques de hautes tensions – DEHT :

Le traitement par DEHT consiste à appliquer un champ électrique de haute intensité entre deux électrodes immergées dans l'eau. De nombreuses études ont démontré l'efficacité du traitement par DEHT pour l'extraction de composés phénoliques à partir du marc de raisin et des huiles à partir des graines de lin [15]. Au jour d'aujourd'hui, aucune étude sur l'extraction assistée par DEHT des polyphénols à partir des écorces n'a été réalisée. L'étude préliminaire a permis de confirmer l'intensification de l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'épicéa commun sous une intensité de 40 kV/cm [15]. En comparaison avec les CEP, les DEHT permettent d'obtenir un meilleur rendement d'extraction. En effet, le traitement par DEHT correspond à une synergie d'effets électriques et également mécaniques. Toutefois, cette technologie est utilisée pour le traitement des gaz, la dégradation des composés organiques contenus dans l'eau, l'inactivation des microorganismes, l'amélioration de l'extraction de composés d'intérêt à partir de bioproduits, etc.

I.6. Avantages et inconvénients des méthodes innovantes:

Les technologies traditionnelles d'extraction solide-liquide (macération, soxhlet, etc.) ont certes démontré leur efficacité mais aussi leurs limites en termes de productivité, de consommation énergétique, de rentabilité et de qualité des extraits pour l'extraction des polyphénols à partir des tissus forestiers. La nécessité de dépasser ces limites a favorisé l'émergence de technologies nouvelles, dont font partie les procédés d'extraction assistée par micro-ondes, par ultrasons, par champs électriques pulsés et par décharges électriques de hautes tensions. Le tableau suivant présente les avantages et les inconvénients des nouvelles méthodes pour l'extraction.

Tableau I.1: Avantages et inconvénients des nouvelles méthodes d'intensification de l'extraction.

Méthode	Avantages	Inconvénients
Ultrasons	<ul style="list-style-type: none"> -Possibilité de travailler à des températures basses -Technique de faible coût facile à mettre en œuvre -Fort rendement d'extraction -Réduction du temps d'opération -Peut être utilisée avec différents solvants comme pour les méthodes conventionnelles 	<ul style="list-style-type: none"> -L'effet des ultrasons sur le rendement et vitesse d'extraction peut être lié à la nature de la matrice de la matière végétale
Micro-ondes	<ul style="list-style-type: none"> -Réduction du temps d'opération -Réduction du volume de solvant -Amélioration du rendement d'extraction 	<ul style="list-style-type: none"> -Les fortes températures peuvent provoquer la dégradation des composés thermosensibles

CEP et DEHT	<ul style="list-style-type: none"> -Fort rendement d'extraction et accélération du procédé d'extraction -Possibilité de travailler à des Températures basses -Faible coût énergétique -Intensification d'extraction -Sélectivité d'extraction pour les CEP -Pas d'additifs chimiques toxiques -Réduction du temps d'extraction -Permet l'extraction de composés thermolabiles : réduction de la température 	<ul style="list-style-type: none"> -DEHT : Industrialisation difficile et cette technique est réservé aux fluides pompables et peu visqueux -CEP : Extraction des composés se trouvant dans la membrane cellulaire et cette technique est réservé aux produits frais avec des membranes cellulaires intactes
-------------	---	--

I.7. Application des polyphénols :

Les propriétés biologiques des polyphénols rendent ces molécules très intéressantes en vue d'une valorisation en tant qu'ingrédient et additif pour différents produits. Ils trouvent des applications diverses et variées dans différents domaines. De nombreux polyphénols sont utilisés comme principe actif dans des médicaments : acide salicylique extrait du saule et ingrédient basique de l'aspirine, la rutoside (rutine), le glycoside de flavonoïde quercétine (quercétine -3-rutinoside) isolé de plusieurs plantes (eucalyptus, sarrasin, sophora) utilisé dans le traitement destinés aux troubles veineux et capillaires, ou encore l'extrait de Ginkgo (Ginkgo biloba) dont le principe actif EGb 761 est riche en composés polyphénoliques et notamment en glycosides de flavonoles (24 % de l'extrait) [15] . On retrouve également sur le marché médical, l'extrait hydro-alcoolique d'écorces et de feuilles du peuplier et d'écorce de frêne, commercialisé sous le nom Phytodolor®, qui sert à traiter l'arthrite et le rhumatisme [15]. Les polyphénols sont également utilisés dans le domaine agroalimentaire comme additif. Cette application est possible en raison de leur

pouvoir colorant et leur activité antioxydante. Ils sont utilisés comme conservateurs et ils permettent également une meilleure stabilisation des denrées alimentaires et des pigments de jus [15]. Toujours dans le domaine agroalimentaire, les polyphénols sont utilisés comme complément alimentaire. On retrouve les polyphénols également dans le domaine cosmétique où ils sont utilisés pour leur pouvoir anti vieillissement de la peau. Enfin, les polyphénols du bois et particulièrement les tannins sont à la base de la fabrication de teintures et la formulation de nombreuses colles et adhésifs naturels [15]. De plus, les tannins ont la particularité de lier et précipiter les protéines et ils sont utilisés dans le domaine du tannage du cuir.

II. INFLAMMATION INTESTINALE

II.1. Définition de l'inflammation intestinale:

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) remontent très probablement à des siècles. Certaines descriptions anatomo-cliniques remontant à l'antiquité sont compatibles avec le diagnostic de MICI. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales sont un trouble inflammatoire chronique multifactorielle du tractus gastro-intestinal (Figure I.6) qui se présente sous deux formes principales: La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Une troisième entité peut être ajoutée, la « colite indéterminée », présentant les caractéristiques d'une colite idiopathique pour laquelle l'ensemble des examens réalisés ne permet pas de trancher entre maladie de Crohn et recto-colite [27]. En 1932 la maladie de Crohn a été décrite dans « Journal of the American Medical Association » par les Docteurs Burrill B. Crohn L. et Ginsberg G.D. Quant à la recto-colite-hémorragique, le premier cas décrit fut reporté par Sir Samuel. Wilks dans « London Medical Times and Gazette » en 1859.

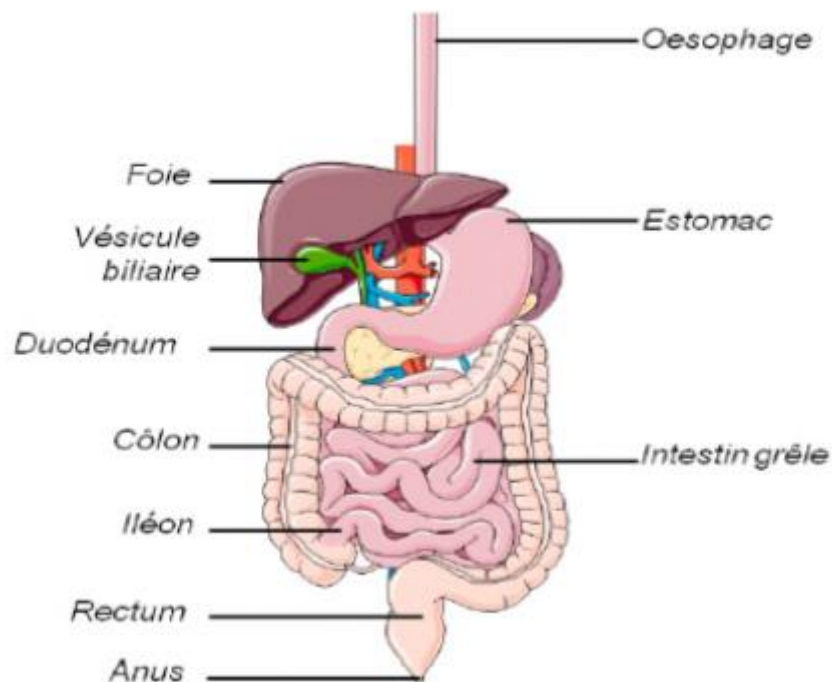


Figure I.6: Différents segments du tube digestif peuvent être atteints en cas de RCH et MC, allant du rectum à l'ensemble du côlon. Illustration réalisée grâce à ServierMedical Art

II.2. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :

II.2.1. La maladie de Crohn :

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de la paroi de l'intestin qui peut atteindre différentes parties de celui-ci, de la bouche à l'anus. Avec la rectocolite hémorragique, elle fait partie des « maladies inflammatoires chroniques de l'intestin » que l'on nomme souvent par les initiales « MICI ». La maladie de Crohn est une affection chronique, c'est-à-dire qui persiste dans le temps, et qui évolue par poussées entrecoupées de phases d'accalmie. Le plus souvent, elle atteint la partie terminale du petit intestin (l'intestin grêle) ou iléon, le gros intestin (le côlon) et l'anus. Elle se manifeste par des troubles de l'appareil digestif mais parfois, elle s'accompagne aussi de douleurs articulaires, de signes cutanés ou oculaires. Chez environ 20 % des malades, les crises peuvent être sévères. Leur intensité peut même imposer une hospitalisation pour

surveillance et traitement avec un arrêt de l'alimentation et un traitement par perfusion pendant quelques jours.

II.2.2. La recto-colite-hémorragique :

La recto-colite-hémorragique (RCH) est une maladie intestinale inflammatoire chronique (MICI), caractérisée par une inflammation superficielle de la muqueuse, des Saignements rectaux, des diarrhées, une douleur abdominale, fièvre, anorexie, perte de Poids, fatigue et sudations nocturnes. Contrairement à la maladie de Crohn; la RCH touche généralement le côlon et l'inflammation est limitée à la muqueuse (Figure I.7) [28]. Dans la RCH, il existe une augmentation substantielle de la sécrétion d'IL-13, l'interleukine principale responsable de l'inflammation et de la chronicité de cette affection [29]. Les patients atteints de la RCH présentent également une réponse Th2 avec une sécrétion accrue d'IL-4, IL-5 et IL-9[30].

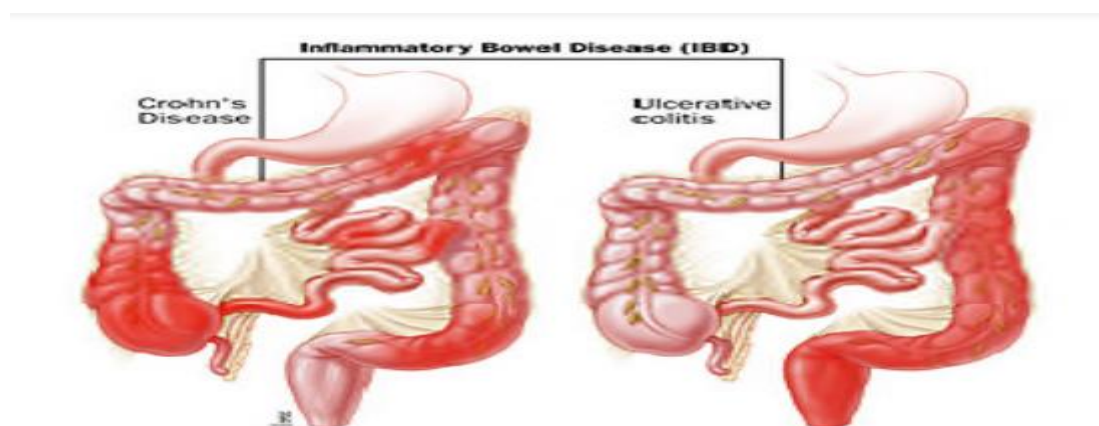


Figure I.7: Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCUH [31].

II.3. Les causes d'une inflammation des intestins :

L'inflammation aiguë des intestins est souvent due à une infection. Celle-ci peut être d'origine virale, bactérienne ou parasitaire. C'est notamment le cas de la gastro-entérite, qui est généralement due à une infection d'origine virale.

Les causes des maladies inflammatoires chroniques des intestins (MICI) sont quant à elles moins connues. Plusieurs paramètres pourraient être impliqués. D'après les données scientifiques actuelles, il existe une prédisposition génétique à certaines MICI telles que la

rectocolite hémorragique. La maladie de Crohn pourrait quant à elle être due à un ensemble de facteurs de risque dont de mauvaises habitudes alimentaires, le tabagisme, la pollution, la consommation d'aliments contaminés, ...

II.4. Traitements pour l'inflammation intestinale:

Les MICI sont le plus souvent diagnostiqués chez des sujets jeunes, âgés de 20 à 30 ans. Toutefois, elles peuvent survenir à tout âge et 15% des cas concernent des enfants. Si leur fréquence varie considérablement d'un pays à l'autre, les taux les plus importants sont retrouvés dans les pays industrialisés, notamment en Europe du Nord-Ouest et aux Etats-Unis. En France, où la prévalence est stable ces dernières années, environ 5 nouveaux cas de maladie de Crohn et autant de rectocolites hémorragiques sont diagnostiqués chaque année pour 100 000 habitants. La prévalence augmente en revanche de façon exponentielle dans les pays en cours d'industrialisation (pays du Maghreb, Asie, Afrique du Sud...) [32]. Il n'existe pas de traitement curatif des MICI, mais les médicaments anti-inflammatoires actuels permettent dans la grande majorité des cas un contrôle durable de la maladie, pendant plusieurs années, associé à une qualité de vie satisfaisante. Ils préviennent l'apparition des poussées et prolongent les phases de rémission en favorisant la cicatrisation des lésions du tube digestif. Lors des poussées, des 5-aminosalicylés (5-ASA) peuvent être prescrits chez les personnes souffrant de forme modérée de rectocolite hémorragique. Par contre, ils ne sont pas efficaces dans la maladie de Crohn. Les corticoïdes sont quant à eux de moins en moins utilisés en raison de leurs effets secondaires à moyen et long terme [32].

Chez les patients dont la maladie est évolutive, les médecins instaurent rapidement un traitement immunomodulateur, pour stopper les crises et éviter l'apparition de nouvelles lésions. Ces médicaments permettent de réguler l'immunité des patients et réduire l'inflammation à long terme. Les plus utilisés sont les biothérapies : les anti-TNF- α et anti-IL12/IL-23 bloquent spécifiquement des facteurs d'inflammation impliqués dans la maladie. Environ 70% des patients répondent bien à ces traitements. Toutefois, chez la moitié d'entre eux, l'efficacité de ces médicaments s'altère au bout de deux ans, nécessitant de changer de molécule. Une nouvelle génération d'immunomodulateur spécifique de l'intestin (vedolizumab) vient d'arriver sur le marché. Il s'agit d'anticorps monoclonaux qui se lient spécifiquement à des molécules d'adhésion présentes à la surface de cellules immunitaires du sang, empêchant leur passage dans le tube digestif. Ce nouveau

médicament est particulièrement bien toléré [32]. Pour les malades résistants à un traitement bien suivi, ou encore suite à l'apparition de complications, un traitement chirurgical peut être proposé. Après 10 ans d'évolution de leur maladie, plus d'un patient sur deux a subi une intervention chirurgicale afin de retirer le segment du tube digestif le plus atteint. Cette proportion devrait diminuer dans les années à venir grâce à l'arrivée de nouveaux médicaments plus efficaces.

Enfin, la fréquence et l'importance des diarrhées peuvent entraîner une carence nutritionnelle. Une supplémentation en fer, acide folique, zinc, magnésium, vitamines... peut être nécessaire, par voie orale ou intraveineuse. Chez l'enfant, il faut parfois recourir à la nutrition entérale, exclusive ou en complément [32].

II.5. Biodisponibilité des polyphénols

La biodisponibilité se définit comme étant la fraction de la dose de médicament administré qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle elle l'atteint. Les polyphénols ont une diversité structurale considérable ce qui influence largement leur biodisponibilité. Les études disponibles sur la biodisponibilité des polyphénols permettent de dresser un schéma général de leur absorption et de leur devenir dans l'organisme [33].

II.6. L'absorption des polyphénols

II.6.1. Absorption au sein de l'estomac:

Seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamiques sous forme liée tels que l'acide chlorogénique peuvent être absorbés directement à partir de l'estomac [34].

II.6.2. Absorption à partir de l'intestin grêle:

Les aglycones de polyphénols (ex.: les flavanols) et les O- β -D-glucosides peuvent être notablement absorbés dans le petit intestin, les premiers par diffusion passive, les seconds selon deux mécanismes [35]: Une absorption directe des glucosides via le transporteur de glucose sodium-dépendant. Elle est suivie par l'hydrolyse des glucosides dans le cytosol par une β -glucosidase cytosolique. Un autre mécanisme impliquant la lactase phloridzine hydrolase, une glucosidase de la bordure en brosse de l'intestin qui catalyse l'hydrolyse extracellulaire des glucosides, a aussi été démontré. Il est suivi par l'absorption de l'aglycone ainsi libéré par diffusion passive.

II.6.3. Absorption à partir du côlon:

Les polyphénols non absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle atteignent le côlon, puis sont catabolisés par la microflore colique, ayant des activités enzymatiques diverses, avant d'être absorbés. En particulier, la rutine, un flavonol commun de l'alimentation (quercétine (3-O- β -D-(L-rhamnosyl--1,6-D-glucoside))), doit être hydrolysée par les enzymes bactériennes avant d'être absorbée au niveau du côlon et atteint la circulation sanguine (sous forme de conjugués de quercétine) avec un retard notable par rapport aux cas des glucosides de quercétine (abondants dans l'oignon), absorbés dès le petit intestin. D'une manière générale, le catabolisme de la microflore colique peut produire des métabolites biodisponibles, en concentration de l'ordre de 1 mM, comme l'acide benzoïque, l'acide phénylacétique et l'acide phénylpropionique[36]. En particulier, les proanthocyanidines ne sont pas biodisponibles sous leurs formes natives et l'absorption est limitée aux catabolites microbiens libérés à partir des oligomères les plus courts [37] [38]. De même, chez les humains, il a été montré que l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, produit par la microflore colique, représente plus de 70% des métabolites de la cyanidine 3-O- β -D-glucoside (principale anthocyane du jus d'orange sanguine) avec une concentration circulante maximale de 500 nM contre seulement 2 nM pour la forme native[39].

II.7.Mécanisme des polyphénols :

Les polyphénols ont la capacité de se fixer aux protéines par un mécanisme de liaison non spécifique associé au groupement phénol ubiquitaire qui favorise les interactions polyphénols/protéines responsables des effets biologiques comme antioxydants.

Ils sont capables de piéger dans l'organisme les radicaux libres qui altèrent les cellules, dégradent l'ADN et entraînent la mort cellulaire.

Par la présence de domaines hydrophobes et hydrophiles, les polyphénols interagissent avec les lipides membranaires des cellules et les protéines par des interactions non spécifiques qui peuvent entraîner des changements fonctionnels sur l'activité des enzymes membranaires, les interactions ligand-récepteur, les flux d'ions et/ou de métabolites et la modulation de la transduction du signal.

La présence du groupement phénol permet également aux polyphénols de s'adsorber, se fixer et/ou s'insérer dans les membranes cellulaires au niveau de la bicouche lipidique ainsi

leur capacité à capturer les radicaux libres adsorbés sur la surface de la membrane pour constituer une barrière physique.

Lorsqu'une interaction spécifique interagit avec les protéines impliquées notamment des enzymes, des récepteurs ou encore des facteurs de transcription cellulaire, il s'agit donc des inhibiteurs efficaces de l'activité d'un très grand nombre d'enzymes, par exemple les enzymes ayant des purines (ATP) comme substrats tels que les kinases, les ATPases, les phosphodiesterases cycliques, les adénylatecyclases, les transcriptases inverses, les xanthines oxydases, les ARN et ADN polymérases, les ribonucléases et les ADN ligases. Étant donné la similitude entre les structures de l'ATP et du NADPH, les enzymes dépendantes du NADPH seraient également affectées par les polyphénols, tels que l'aldose réductase, la malate déshydrogénase, le lactate déshydrogénase, l'oxyde nitrique synthase et la glutathione réductase.

Une autre spécificité intéressante des polyphénols porte sur le pouvoir de modulation des facteurs de transcription cellulaire, notamment le facteur de transcription nucléaire NF- κ B hautement impliqué dans la réponse immunitaire pro-inflammatoire comme les cytokines (ex : TNF- α , IL-6), les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et les molécules d'adhésion cellulaire (ex : ICAM). Ces médiateurs de l'inflammation peuvent induire la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et ainsi générer une boucle de ré-contrôle positive. Il a été suggéré que le stress oxydatif et l'inflammation constituent des mécanismes homéostatiques/compensatoires maintenant la balance physiologique tissulaire. Lorsqu'un des mécanismes surcharge chroniquement l'autre, il y a un déséquilibre qui entraîne l'altération des processus physiologiques [40].

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

INTRODUCTION

L'objectif de cette partie est l'extraction des composés phénoliques de la pellicule du marc de raisin suivi d'une analyse phytochimique.

Cette partie comprend également une étude *in vivo* afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire intestinal des composés phénoliques extraits.

I. MATERIELS

➤ Réactifs chimiques:

- ✓ acide acétiques a 5%
- ✓ Solution saline à 0,9%

➤ Médicaments:

- ✓ **Anesthésiant:** Acepromazine (10 mg/ml)
- ✓ **Produit de référence :** sulfasalazine (100 mg/kg) → $C_{18}H_{14}N_4O_5S$

Le sulfasalazine appartient à la famille des sulfamides et des salicylés, il a une action anti-inflammatoire sur la muqueuse intestinale .Il est utilisé dans le traitement de :

- l'arrectocolite hémorragique,
- certaines formes de la maladie de Crohn,
- la polyarthrite rhumatoïde.

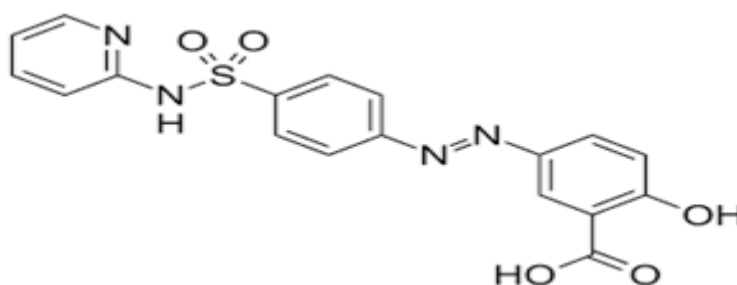


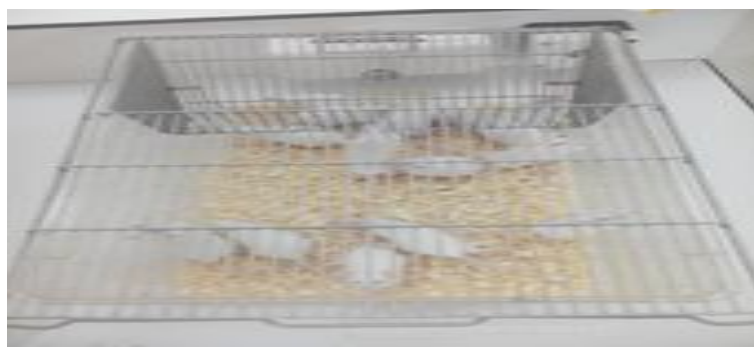
Figure II.1 : Structure chimique de la sulfasalazine.

Tableau II.1 : Identification chimiques et propriétés de la sulfasalazine.

formule moléculaire	$C_{18}H_{14}N_4O_5S$
Nom UICPA	Acide 2-hydroxy-5-[(E)-2-{4-[(pyridin-2-yl) sulfamoyl]phényl}diazén-1-yl] benzoïque
Masse molaire	398.39 g/mol

➤ **Animaux:**

Des souris albinos NMRI pesant entre 20 à 40 g, d'âge moyen de 5 semaines ont été utilisées pour l'étude *in vivo*. Les souris proviennent de l'animalerie de l'institut Pasteur d'Algérie. Les souris ont été mise en cage polystyrène et maintenues dans des conditions standard de température ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), d'humidité relative ($55 \pm 10\%$) et de 12 h / 12 h de cycle lumière / obscurité, et nourries avec un régime alimentaire standard en granulés et de l'eau *ad libitum*.

**Figure II.2 : les souris albinos dans une cage polystyrène.**

➤ **Matériel végétal:**

• **L'extrait phénolique:**

Le marc de raisin a été séché à 60°C , broyée et conservé jusqu'à l'utilisation le PA utilisé dans notre travail a été extrait au niveau de laboratoire d'analyse fonctionnelle des procédés chimique (LAFPCI) département Génie des Procédés Université de Blida 1.



Figure II.3: la pellicule broyée du marc de marc de raisin.

II. METHODES

II.1.Préparation de l'extrait :

Les échantillons de marc de raisin secs ont été placés dans un bécher contenant l'éthanol C_2H_5OH comme solvant d'extraction. Le bain ultrason fonctionne à une fréquence de 25 kHz, et une température de 20°C pendant une durée totale de 15min.

Après l'extraction, l'échantillon a été soumis à une centrifugation, élimination du solvant avec un rot vapeur et lyophilisation pour éliminer l'eau.



Figure II.4 : Bain ultrason.

II.2. Analyses phytochimiques d'extrait phénolique :

Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols totaux des extraits ont été déterminés par la méthode de Follin-Ciocalteu. Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage est basé sur une réaction d'oxydo-réduction. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène [41]. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits obtenus.

Mode opératoire :

Un volume de 0,2 mL de l'extrait dilué est mélangé avec 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 5 minutes d'agitation, 5 mL de carbonate de sodium à 5 % est additionné.

Le mélange est dilué jusqu'à 25mL. Ensuite, incubé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 90 minutes. L'absorbance est lue à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (UV Visible). La concentration en composés phénoliques totaux est exprimée en mg équivalent de l'acide gallique par g (mg EAG/g) en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique.

II.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC:

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelée aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.). Dans nos

études, des détecteurs UV basés sur la mesure de la longueur d'onde des composés ont été utilisés. Le schéma (Figure II.5) présente le principe général de la méthode [42].

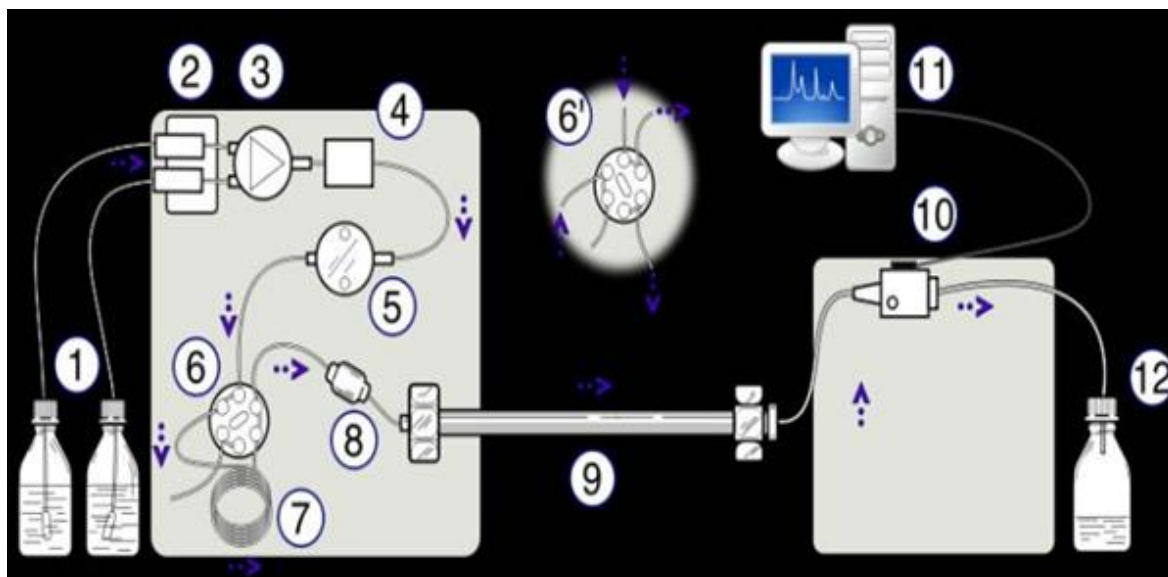


Figure II.5 : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance.

1, Réservoirs des solvants, 2 - Dégazeur, 3- Valve de gradient d'élution, 4 - Doseur de phase mobile (ou éluant), 5 - Pompe à haute pression, 6 - Vanne d'injection en position "inject", 6' -Vanne d'injection en position "load", 7 - Boucle d'injection de l'échantillon, 8- Pré colonne (éventuelle), 9-Colonne analytique, 10-Détecteur, 11 - Acquisition du signal, 12 -Décharge déchets.

Condition opératoires de l'analyse par HPLC:

Le dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été réalisé à l'aide d'un appareil d'analyse de marque YL-9100, composé d'un détecteur UV- Visible, d'un dégazeur pour éliminer les bulles d'air dans la phase mobile, d'un injecteur à boucle manuelle de capacité 20 μL et d'un four à température fixe 25°C. Les résultats ont été traités à l'aide du logiciel YL-Clarity.

Pour l'analyse qualitative des polyphénols ,20 μL d'échantillon, préalablement dilué dans 0.1 % de méthanol et filtré à l'aide de filtre seringue 0,45 μm , sont injectés dans une colonne C18 (4.6 \times 150) mm, 5 μm , (Agilent USA). La température de la colonne est fixée 25°C. La phase mobile utilisée pour la séparation des composés est également constituée

de deux solvants : Solvant A = eau acidifiée à 1% d'acide acétique et Solvant B = méthanol grade HPLC, le débit est de 1 ml/min.

II.4. Etude in vivo de l'inflammation intestinale :

L'évaluation de l'activité anti-ulcéreuse du polyphénol nécessite le développement, chez un modèle animal, d'une forme de pathologie telle qu'elle est retrouvée chez l'humain

Avant de commencer l'expérimentation les souris ont été pesées, marquées et réparties en cinq lots (n=10). Chaque souris après est mis à jeun pendant 16h. On a choisi des souris femelles étant donné que les souris mâles se battent, ce qui peut entraîner l'induction non désirée d'une réponse inflammatoire induite par le stress.

II.4.1. Induction de la colite ulcéreuse:

L'induction de la colite chez la souris par des substances chimiques est l'une des méthodes les plus utilisées pour produire un modèle expérimental de maladie intestinale inflammatoire. L'acide acétique induit des dommages graves aux muqueuses, après une seule administration. Ce dernier libère des protons dans l'espace intracellulaire, provoquant une acidification intracellulaire massive entraînant un dommage épithélial immense, ce qui en résulte d'une inflammation aiguë suite à des lésions de l'épithélium, accompagnées d'une hémorragie généralisée, et la libération des médiateurs pro-inflammatoires et des métalloprotéines participant à l'augmentation de la perméabilité de barrière épithéliale intestinale au cours des MICI [43].

la RCUH a été induite chez tous les lots sauf le lot témoin par administration de 0,5 ml de solution d'acide acétique à (5%) par voie intra-rectale à l'aide d'un tube en polypropylène de 2 mm de diamètre (Figure II.16), les souris ont été maintenues en position tête en bas pendant 20 à 30 secondes pour éviter la fuite de l'acide acétique intra colique. La nourriture et l'eau ont été redonnées aux souris à volonté [44].



Figure II.6 : Injection de l'acide acétique (Injection rectale).

II.4.2. Traitement :

2 h après induction de la colite à l'acide acétique procéder à l'administration des traitements mis à l'essai .Le premier lot (T) recevant 0,5 ml de l'eau physiologique est considéré comme lot témoin qui servira d'un modèle montrant le côlon dans son état physiologique. Le deuxième lot (AC) recevant de l'eau physiologique et de l'acide acétique qui servira d'un modèle montrant le colon malade. Le troisième lot (R) est traité avec le médicament de référence salazopyrine® (sulfasalazine 100 mg/Kg), le quatrième et le cinquième lot (E1, E2) sont traités respectivement avec l'extrait phénolique à différentes concentrations 1.4mg et 2 mg. Cette procédure a été répétée quotidiennement pendant 7 jours pour voir l'évolution du traitement de la colite.



Figure II.7 : Administration par gavage.

Il est important de savoir que la durée du traitement dépendra de la gravité des symptômes apparues, et surtout du taux de mortalité et dans les cas où le taux est important il faut procéder à l'autopsie

II.4.3. Observations générales et score clinique

La mesure du poids corporel des animaux, la consistance des selles, et le saignement rectal, pour chaque groupe ont été enregistrés quotidiennement. Le score de chaque paramètre a été déterminé selon Cooper et al. ; [45]. Comme suit: variation de la perte du poids corporel (0: aucune, 1: 1-5%, 2: 5-10%, 3: 10-20%, 4: > 20%), selles hémorragique (0: négative, 2: saignement léger, 4: saignement important), et la consistance des selles (0: normal, 1 et 2: selles molles, 3 et 4: diarrhée).

L'indice d'activité de la maladie (DAI) a été calculé comme la somme des trois scores précédents: la perte de poids, la consistance des selles et le saignement du côlon.

Le pourcentage de perte du poids corporel (PPC%) a été calculé comme suit:

$$\text{PPC\%} = [(P_{j0} - P_{jx}) / P_{j0}] \times 100$$

P_{j0} : poids initial de la souris (au jour 0)

P_{jx} : poids de la souris à n'importe quel jour de traitement (jour x)

II.4.4. Score macroscopique

A la fin de l'expérience, les souris ont été sacrifiées et les colons ont été excisés. Avant la fixation et l'homogénéisation du côlon, sa longueur a été mesurée entre la jonction iléo-cæcale et le rectum proximale et son poids a ensuite été mesuré. Les colons ont été ouverts longitudinalement et l'intensité des dommages coliques visibles ont été macroscopiquement évalués, tel que l'augmentation de la largeur du côlon et l'épaississement de sa paroi, ainsi que le score des dommages macroscopiques qui a été attribué selon les critères suivants: (0: aucun changement macroscopique, 1 et 2: érythème muqueux, érosion et ulcération légère, 3 et 4: ulcération grave, érosions sévères, œdème) [46].

II.4.5. Sacrifice et prélèvement des organes:

Le sacrifice des animaux a été effectué après le septième jour de traitement par dislocation cervicale, on fait une dissection abdominale et on prélève le colon délicatement, en coupant soigneusement au niveau de la partie de la jonction Iléo-Coecale et celle du rectum proximal. Ensuite, on a enlevé les adhérences et on rince délicatement le colon avec de l'eau physiologique.

On pèse le colon et on mesure sa longueur à l'aide d'une règle graduée ou d'un pied à coulisse digital. A l'aide d'une loupe et d'une lampe wood faire le score macroscopique à savoir la cotation des ulcères et toutes les observations cliniques macroscopiques.

A la fin de l'étude on récupère une partie du côlon, du foie, et on les met dans du formol à 10% pour une éventuelle étude histopathologique, l'autre partie restante du colon doit être conservé au congélateur afin d'effectuer l'analyse des paramètres du stress oxydatif.



Figure II.8: Sacrifice des animaux.



Figure II.9:Extraction du côlon de l'abdomen de souris.

CHAPITRE III:

RESULTATS

ET DISCUSSIONS

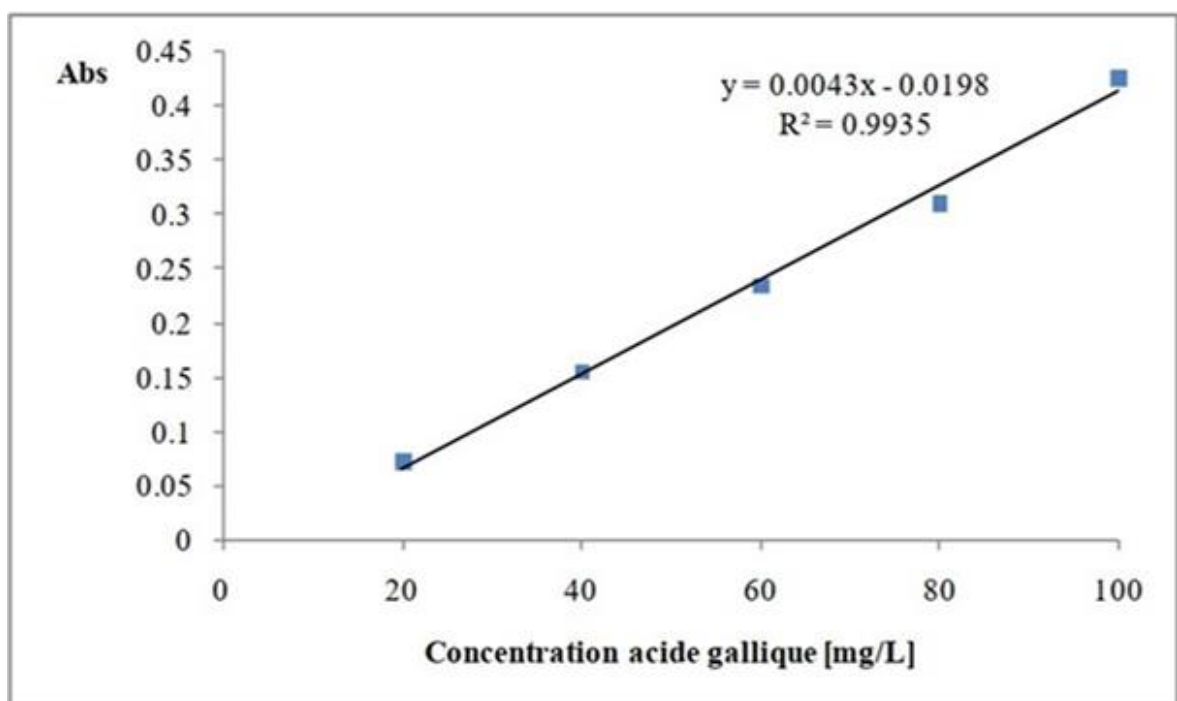
INTRODUCTION

Ce chapitre regroupe les résultats des différents tests obtenus et leur interprétation. Nous avons procédé par l'extraction et la caractérisation des produits qui ont été préparées, Ensuite on s'est intéressé à l'étude in vivo qui a été réalisés sur des souris (albinos) pour démontrer l'efficacité des polyphénols contre l'inflammation intestinale.

I. CARACTERISTIQUES DE L'EXTRAIT PHENOLIQUE

I.1. La teneur des polyphénols :

Le taux des polyphénols totaux dans notre extrait, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire, établie avec des concentrations précises d'acide gallique (20-100 mg/L), (Figure III.1) comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.



FigureIII.1: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

L'extrait phénolique du marc de raisin a donné une teneur importante en polyphénols la 102.4 mg EAG/g de MS.

I.2. Analyse par chromatographie liquide a haute performance :

L'analyse par HPLC de notre extrait nous a permis d'obtenir le chromatogramme suivant (FigureIII.2).

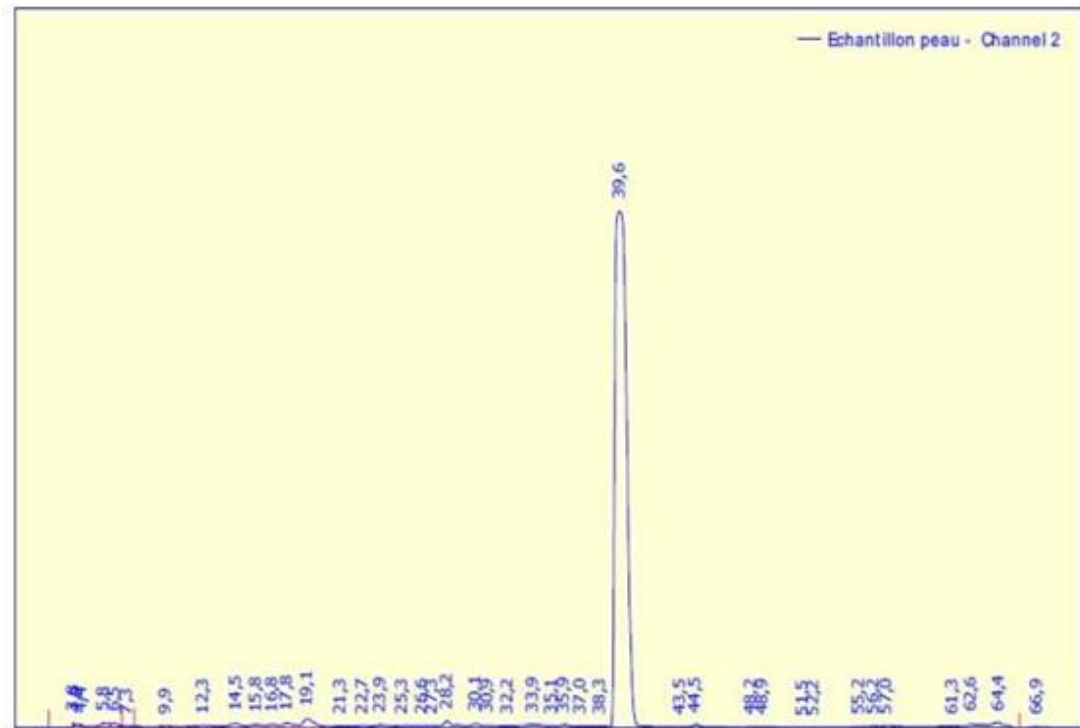


Figure III.2: Chromatogramme HPLC de l'extrait obtenu de la pellicule de baie de raisin.

Basé sur l'analyse HPLC, un seul type de composés organiques a été identifié dans l'extrait de la pellicule .Les aires des pics obtenus montrent que les quantités diffèrent. Les différences sont très nettes entre les deux chromatogrammes de deux échantillons. Le composé pouvant identifié dans la pellicule était situé à 39,6 minutes pour l'acide trans 2,4-dimétoxycinnamique $C_9H_8O_2$.

II. ANALYSES CLINIQUES :

II.1. L'évolution pondérale des souris :

La figure suivante représente l'évolution du poids des souris traitées par les différentes doses ainsi que celles qui sont traitées par le médicament de références.

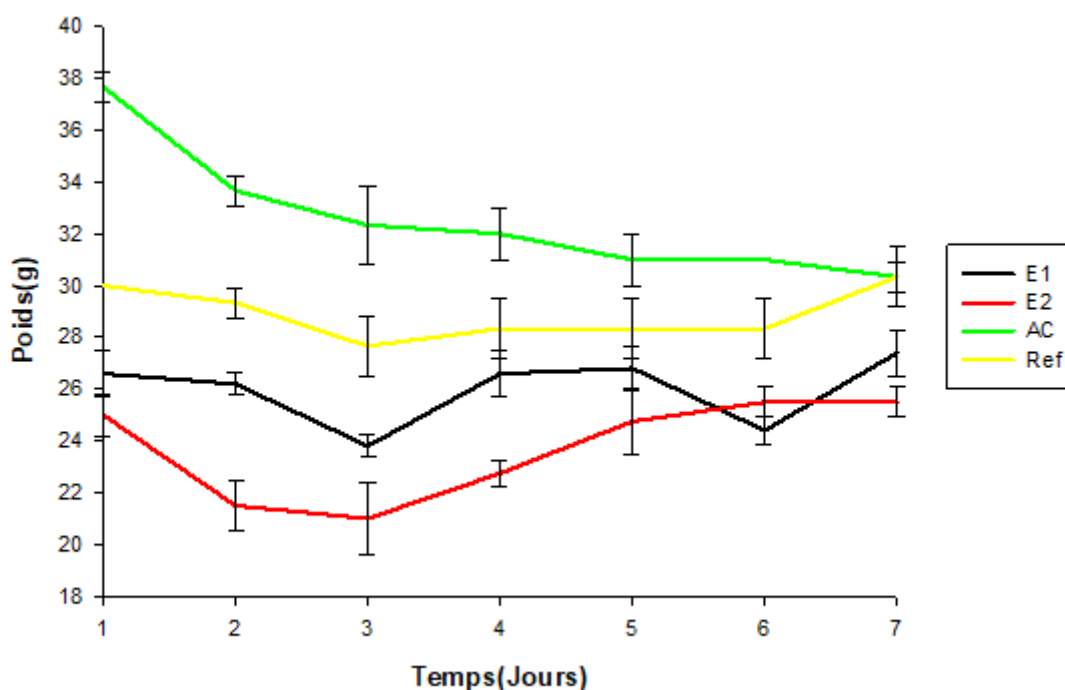


Figure III.3: Evolution du poids des souris traitées par les différentes doses de l'extrait phénolique.

Les souris des groupes traités à l'acide acétique ont rapidement développé une colite très grave, et les signes typiques: la diarrhée sanglante, la réduction de la mobilité et de la consommation de nourriture et la perte du poids corporel, ont été observés, en plus d'un taux de mortalité très élevé. Le traitement par l'extrait phénolique améliore les paramètres mentionnés ci-dessus d'une manière dose-dépendante, et augmente le taux de survie des souris.

Les souris traitées par la dose E1 d'extrait phénolique et le médicament de référence ont commencé à reprendre leurs poids au bout du 6^{ème} jours, tandis que pour les autres lots c'est au bout de 4^{ème} jours.

Comme un type de maladie inflammatoire dans le tractus intestinal, la colite ulcéreuse commence généralement dans le rectum et peut s'étendre de manière continue à impliquer la totalité du côlon et du rectum avec les symptômes suivants: une diarrhée, des douleurs abdominales, des selles sanglantes, une fièvre et une perte de poids [47]. Dans cette recherche, par rapport au groupe contrôle de la colite, l'administration de l'extrait phénolique et de la sulfasalazine a empêché la réduction du poids corporel. (Annexe 1)

II.2. Evaluation de l'indice d'activité de la maladie:

L'indice d'activité de la maladie (DAI) a été utilisé pour évaluer le degré et l'étendue de l'inflammation intestinale, qui a été quantifiée par un score clinique évaluant la perte de poids, la consistance des selles et les saignements qui ont été enregistrés quotidiennement. (Annexe 02). L'indice d'activité de la maladie est déterminé en utilisant une échelle allant de 0 à 5 comme suit : (0-2: Absence de la pathologie ; 2-3: faible installation de la pathologie ; 4-5: installation de la pathologie)

Le sang est apparu dans les selles de tous les groupes traités avec de l'acide acétique après l'induction de la colite. Le traitement par l'extrait phénolique a diminué ces selles hémorragiques. Les changements de la consistance des selles en une diarrhée ont été observées immédiatement après l'administration de l'acide acétique chez tous les groupes traités, cet état a été amélioré après le traitement avec l'extrait phénolique. (Figure III.4)

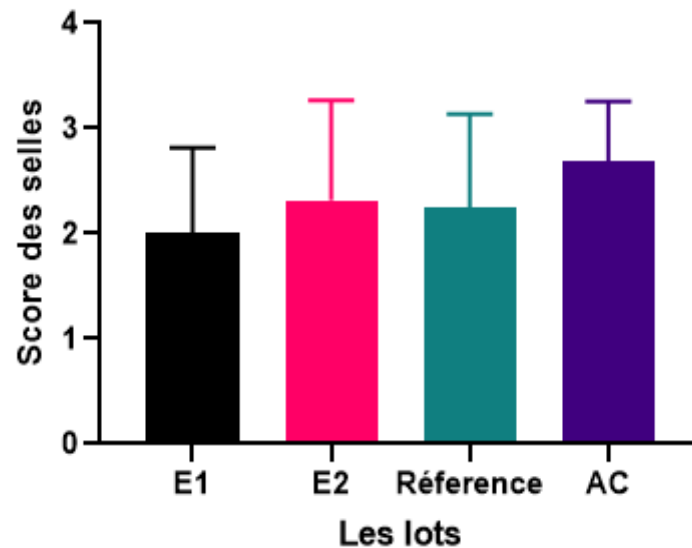


Figure III.4.Score de la consistance selles des souris

Aucun des changements décrits ont été observés dans le groupe normal contrôle. Cependant, les souris ont montré une augmentation de la diarrhée avec du sang et du mucus dans la phase précoce après l'induction de la colite avec de l'acide acétique (Figure III.5). Cela pourrait être dû aux effets néfastes directs de l'acide acétique ainsi que des altérations de la fonction épithéliale par les produits libérés à partir des mastocytes activés [48]. Nous avons également constaté que le traitement avec l'extrait phénolique a diminué la diarrhée et le sang dans les selles, et il a amélioré le poids corporel des souris, cela est dû à la restauration des fonctions épithéliales [48].

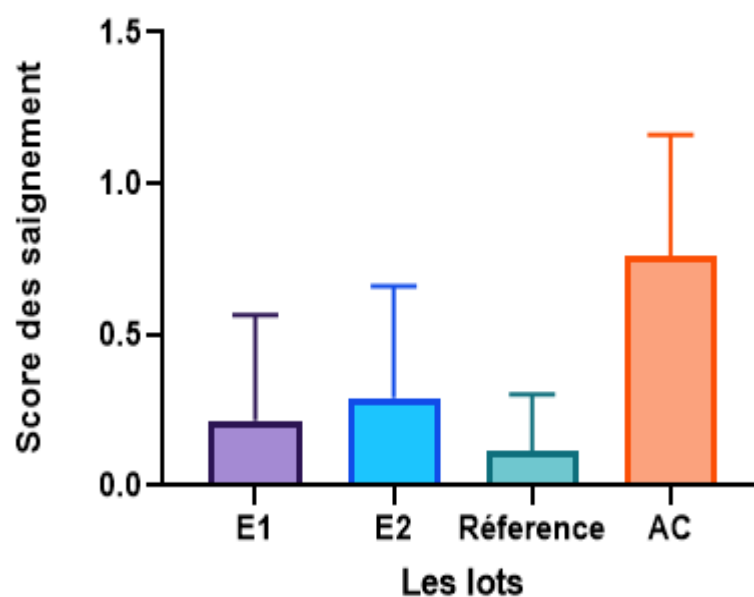


Figure III.5.Score des saignements dans les différents lots.

Pour ce qui est du lot traité à la Sulfasalazine (100mg/Kg), une légère diarrhée a été enregistrée. Ceci est dû au potentiel minime du médicament à inhiber les dommages et l'apoptose des cellules épithéliales intestinales en réduisant partiellement le niveau de TNF- α dans la RCUH induite par l'acide acétique [49]. Ils n'ont présenté aucun saignement, Les souris de ce lot ont subi des coliques abdominales; des trémulations, pilo érection.

Les résultats obtenus (diarrhée et le saignement rectal) ont été validés par des études in vivo [49] dont la RCUH a été également induite par l'administration d'acide acétique chez des rats. Ces caractéristiques et ces symptômes (diarrhée et rectorragie) retrouvés chez le groupe contrôle s'apparentent fortement à ceux observés chez des patients atteints de la rectocolite ulcéro-hémorragique.

Par conséquent, les deux dose de l'extrait phénolique réduit l'indice d'activité de la maladie (DAI), un paramètre clinique qui reflète la gravité de la perte du poids corporel, les saignements rectaux et de la consistance des selles (Figure III.4). Ce qui montre le potentiel thérapeutique de cet extrait à améliorer les symptômes de cette maladie intestinale inflammatoire.

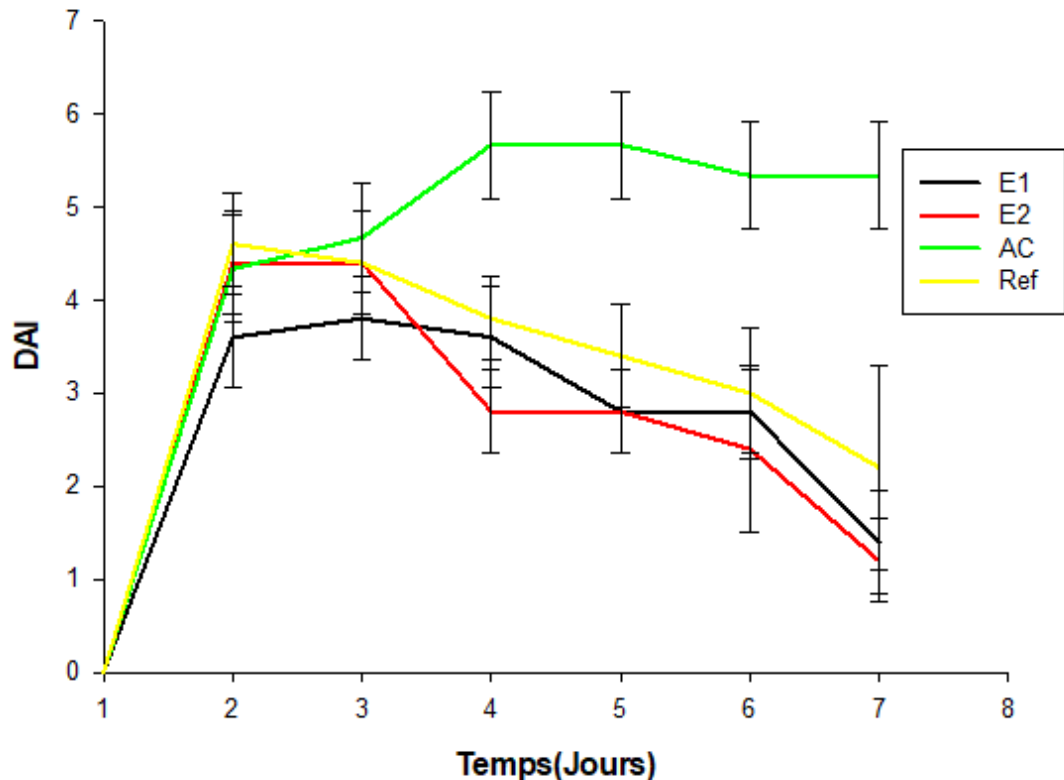


Figure III.6:Évaluation de l'indice d'activité de la maladie des différents lots.

II.3.Evaluation macroscopique de la colite:

Le score d'inflammation macroscopique du côlon a été évalué en utilisant le modèle d'évaluation du score de Prabhu & Guruvayoorappan, une échelle allant de 0 à 4 qui indique les dommages causés par l'induction de l'acide acétique, la sévérité de la RCUH et le degré de l'inflammation. Les critères d'évaluation des dommages macroscopiques sont basés sur les caractéristiques cliniques en utilisant une échelle allant de 0 à 4 comme suit : (0 : aucune modification macroscopique ; 1 : érythème de la muqueuse uniquement ; 2 : léger oedème de la muqueuse, léger saignement ou petites érosions ; 3 : oedème modéré, légers ulcères saignants ou érosions ; 4 : ulcération grave, œdème et nécrose tissulaire) [50].

La réponse inflammatoire initiée par l'acide acétique augmente la production des espèces réactives de l'oxygène, comme les radicaux hydroxyles et les peroxydes conduisant à l'érosion de la muqueuse et la distorsion. Il a été montré que l'inflammation du côlon est une réponse immunitaire locale intense caractérisée par une augmentation d'infiltration des neutrophiles dans le tissu intestinal, l'œdème, l'ulcération et la nécrose [51] [52]. Le changement du poids corporel et le score des dommages macroscopiques étaient les

principaux paramètres pour évaluer le degré d'inflammation du côlon dans la maladie inflammatoire de l'intestin [53].

Donc, l'activité macroscopique de la colite induite par l'acide acétique a été observée dans notre étude. Les côlons des souris traitées par l'acide acétique ont montré une inflammation sévère caractérisée par une ulcération marquée, un oedème et des érosions, alors que les côlons des souris témoins normales n'ont montré aucune inflammation. Le traitement avec l'extrait phénolique et la sulfasalazine a diminué tous les paramètres décrits ci-dessus dans les côlons (Figure III.5)

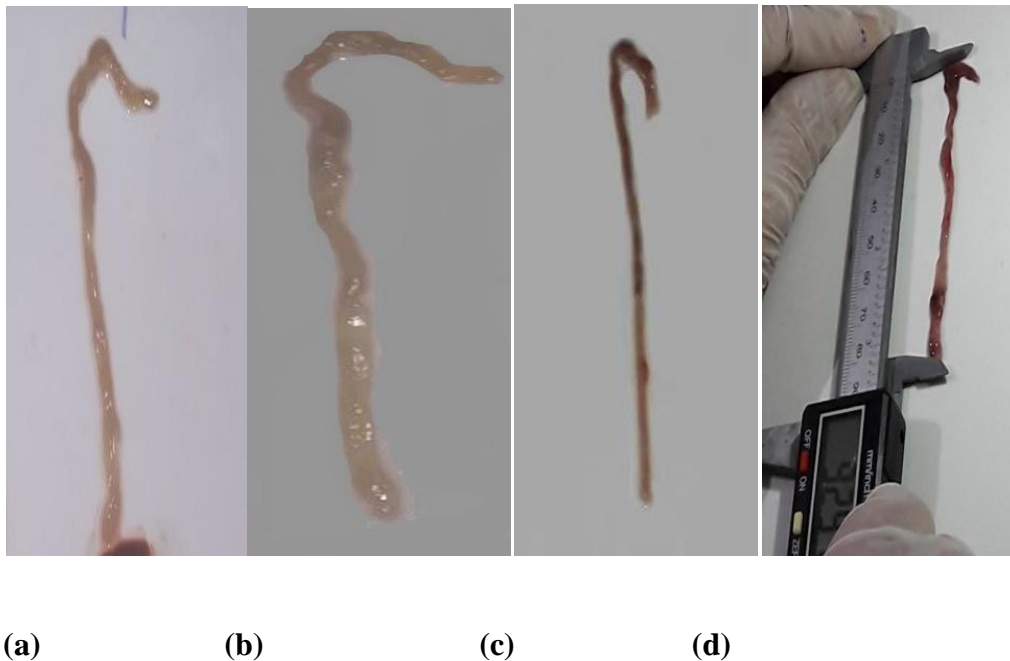


Figure III.7: Morphologie des colons après traitement ; (a) : souris traite avec l'extrait phénolique (lot E1) ;(b) : souris traite avec l'extrait phénolique (lot E2) ;(c) : souris traite avec le Sulfasalazine (lot Ref) ;(d) : souris du lot acide acétique.

La sévérité de la colite induite par l'acide acétique a été évaluée par l'analyse du score macroscopique. L'administration de l'extrait phénolique a amélioré le score macroscopique après l'instillation de l'acide acétique de façon significative (annexe 3). Dans le groupe normal contrôle il n'y avait aucun dommage visible. Par conséquent, le traitement avec l'extrait phénolique et la sulfasalazine pourrait inhiber la colite ulcéreuse de façon très significative.

II.4.L'évolution pondérale et la longueur du côlon :

Le poids du côlon inflammé est considéré comme un indicateur fiable et sensible pour démontrer la gravité de la réponse inflammatoire [5]. La longueur du côlon est un autre paramètre affecté lors de la rectocolite ulcéro hémorragique. Le passage à la chronicité de la maladie entraîne un raccourcissement du côlon suite à l'apoptose des cellules épithéliales et l'altération de leur fonction proliférative [54]. De même, le rapport poids/longueur sont considérés comme un indice de l'inflammation locale avec les autres paramètres de l'œdème et l'épaississement de la paroi du côlon [5].

En accord avec les conclusions ci-dessus, l'enquête présente a démontré que, l'instillation intrarectale d'acide acétique a causé des inflammations oedémateuses macroscopiques très graves dans le côlon, ce qui induit un raccourcissement du côlon et l'augmentation de son poids (Figure III.6), ainsi que l'augmentation de son épaisseur et de sa largeur. Tandis que de tels changements ont été améliorés par le traitement avec l'extrait phénolique, indiquant ainsi son effet curatif de la colite ulcéreuse. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Topcu-Tarlacalisir et al., dans leur étude sur le processus inflammatoire, et qui ont signalé une corrélation positive entre le rétrécissement du côlon à la chronicité de la maladie[55].

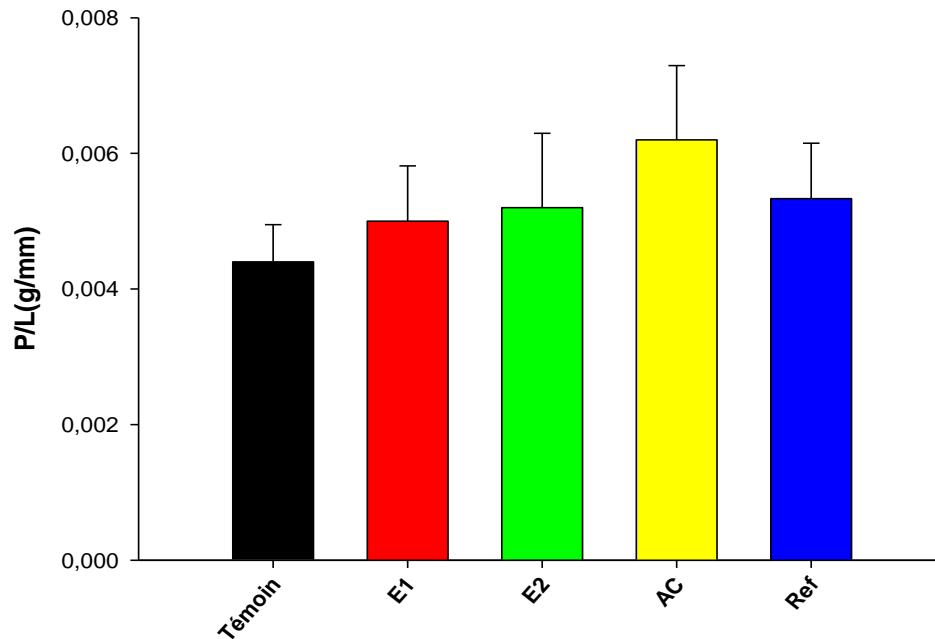


Figure III.8 : le rapport poids / Longueur des différents lots.

Plusieurs études ont suggéré que l'instillation intrarectale de l'acide acétique a causé une insuffisance dans la macroscopie colique caractérisée par des changements dans la longueur, le poids, l'épaisseur et la largeur du côlon en raison de la nécrose de la muqueuse et l'inflammation qui se prolonge dans la couche sous-muqueuse, ou des couches musculaires [56].

L'augmentation considérable du poids du côlon, du rapport poids/longueur du côlon, de la diarrhée, des saignements rectaux, du score macroscopique, des altérations histologiques, de l'érosion des cellules épithéliales et de la diminution du poids corporel, sont des indicateurs de la sévérité de l'inflammation en cas de colite [57]. Dans notre étude, l'instillation de l'acide acétique seul provoque l'élévation significative de ces paramètres. Cependant, le traitement par l'extrait phénolique conduit à une diminution des paramètres mentionnés ci-dessus, ce qui explique ses activités anti-inflammatoires et anti-ulcéreuses.

CONCLUSION

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ceci est notamment le cas des composés phénoliques qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anticancéreux, antibactériennes, anti-cancérigène, antioxydant et anti-inflammatoires.

Dans l'objectif de la valorisation de l'effet thérapeutique du marc de raisin, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire intestinale des polyphénols extraits à partir de la pellicule de marc de raisin

Deux aspects principaux sont visés par ce travail, le premier était l'extraction des composé phénolique à partir d'une biomasse végétale et d'évaluer les teneurs de ces molécules bioactives. Le second de nature thérapeutique qui a été mis en évidence par des tests in vivo pour une inflammation intestinale.

Les composés phénoliques du marc de raisin pourraient avoir une utilisation potentielle dans la gestion et le traitement des MICI en raison de son activité anti-inflammatoire. La présente étude suggère que l'extrait de la pellicule exerce un effet anti-inflammatoire intestinal sur un modèle de colite expérimentale induite par l'acide acétique chez des souris, qui ressemble à une colite humaine (RCH).

L'effet anti-inflammatoire intestinal de l'extrait de la pellicule a été confirmé après l'évaluation macroscopique des échantillons de la partie distale du côlon, Ceci a été mis en évidence par une réduction significative des scores microscopiques par rapport au groupe acide acétique non traité avec les deux doses de l'extrait phénolique. Le traitement avec ces deux doses a montré une réduction significative de DAI; le poids du côlon et dans l'amélioration de la longueur de ce dernier, tout simplement une amélioration générale de l'état clinique des souris traitées, le traitement favorise la réduction du rapport P/L du colon. Toutefois, il semble raisonnable de supposer que l'extrait est extrêmement bien toléré par les souris couramment utilisées pour les études pharmacologiques précliniques.

De plus, ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les études sur l'échelle moléculaire pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules et les utiliser en médecine moderne par la détermination des mécanismes d'interaction entre les molécules et les cellules cibles et l'évaluation de la toxicité subchronique et chronique de ces dernières.

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Ces perspectives se résument par:

- Une étude histopathologie pour confirmer l'effet anti inflammatoire.
- Augmenter le nombre de lots des souris pour avoir des résultats plus significatifs.
- Tester l'extrait phénolique sur d'autres types de maladies d'inflammation intestinale.
- Encapsulation de produit et étudier la libération prolongée.

