

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**

**Bioformulation à base de biomasse végétale : Effet préventif et thérapeutique dans un modèle in vivo de la maladie inflammatoire de l'intestin.**

Présenté par :

- M<sup>lle</sup> BRAHIMI Amina
- M<sup>lle</sup> BENNANI Rima

Encadré par :

- M<sup>me</sup> Laribi H.

Co-encadré par :

- Dr BENALI Y.
- M<sup>lle</sup> SAADOUNE Z.

Année universitaire 2018/2019

## **RESUME**

L'objectif de ce travail est la microencapsulation d'un principe actif (extrait phénolique) par l'alginate de sodium sous forme de billes sphérique solide. Et la caractérisation par IR, analyse par microscope optique, détermination de taux d'humidité, taux de gonflement, mesure de diamètre de billes et la densité. Ainsi que, l'étude de la libération du principe actif.

Les résultats expérimentaux ont montré que la cinétique de libération que pour des billes de composition (2% Alginate, 16,5 mg d'extrait phénolique) le rondement de la libération atteint 98% au bout de 3h. l'étude par spectrométrie Infrarouge a permis de confirmer la microencapsulation du PA.

Dans un deuxième temps, nous avons provoqué une inflammation colique chez des souris suivie par un traitement à l'aide des microcapsules et du médicament de référence. Des sacrifices et des prélèvements du colon ont été effectuées pour étudier l'évolution de la guérison des souris. Un examen anatomopathologique est réalisé afin d'évaluer l'effet de notre extrait sur l'inflammation colique en comparaison avec le médicament de référence.

**Mots clés :** polyphénols, Marc de raisin, rectocolite, anti-inflammatoire, encapsulation, alginate de sodium.

## **ABSTRACT**

The objective of this work is the microencapsulation of an active ingredient (phenolic extract) with sodium alginate in the form of solid spherical beads. And characterization by IR, optical microscope analysis, determination of moisture content, swelling rate, ball diameter measurement and density. As well as, the study of the release of the active ingredient.

The experimental results showed that the kinetics of release only for beads of composition (2% Alginate, 16.5 mg of phenolic extract) the rounding of the release reached 98% after 3 hours. the infrared spectrometry study confirmed the microencapsulation of PA.

In a second step, we caused colonic inflammation in mice, then we treated these mice with microcapsules and the reference drug. Sacrifices and colon samples were made to study the evolution of mouse healing by anatomopathological examination in order to evaluate the effect of our extract on colonic inflammation in comparison with the reference drug.

**Keywords:** Polyphenols, grape marc, colitis, anti-inflammatory, encapsulation, sodium alginate

## ملخص :

الهدف من هذا العمل هو الانغماس الدقيق للمكون النشط (المستخلص الفينولي) مع ألبينات الصوديوم في شكل حبات كروية صلبة. والتوصيف بواسطة الأشعة تحت الحمراء ، وتحليل المجهر الضوئي ، وتحديد محتوى الرطوبة ، ومعدل التورم ، وقياس قطر الكرة والكثافة. وكذلك دراسة الإفراج عن المادة الفعالة

أظهرت النتائج التجريبية أن حركة الإطلاق فقط لحبات التكوين (2 ٪ ألبينات ، 16.5 ملغ من المستخلص الفينولي) وصلت تقريبا الإصدار إلى 98 ٪ بعد 3 ساعات. أكدت دراسة قياس الطيف بالأشعة تحت الحمراء الكبسولة الدقيقة للعنصر النشط

في المرة الثانية، تسببنا في التهاب القولون في الفئران، ثم تعاملنا مع هذه الفئران باستخدام الكبسولات الصغيرة والدواء المرجعي. وقدمت التضحيات وعينات القولون لدراسة تطور شفاء الفئران وهذا عن طريق الفحص المرضي لتقييم تأثير مستخلصنا على التهاب القولون بالمقارنة مع الدواء المرجعي.

**الكلمات الرئيسية:** البوليفينول، ورق العنب، التهاب القولون، المضادة للالتهابات، التغليف. ألبينات الصوديوم.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH, celui qui donne puissance, honneur et considération et qui nous a donné la force, la patience et la volonté de réaliser et d'accomplir ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements et témoignons notre immense gratitude à toutes les personnes qui nous ont apporté leur aide lors de la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, 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. Permettez- nous de vous exprimer ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Nous adressons nos sincères remerciements à Docteur BENALI chef de département microbiologie pathologie vétérinaire à l'institut Pasteur d'Algérie, de nous avoir accueilli au sein de son laboratoire et faciliter notre travail de recherche.

Aux membres du jury pour avoir accepté de lire et de juger ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de nos vifs remerciements.

Nous tenons à remercier également, Monsieur Omar BOURAS, Professeur à l'Université de Blida 1, Département de Génie des Procédés, pour son écoute, sa patience ainsi que ses remarques avisées.

Nous remercions également, Docteur KEZZAL, chef du laboratoire de contrôle qualité des produits biologiques à l'institut Pasteur d'Algérie, pour son accueil au sein de son laboratoire.

Nos sincère remerciements à docteur DERRAR, responsable du laboratoire grippe et virus respiratoires à l'institut Pasteur d'Algérie, pour son accueil, sa gentillesse et toute l'aide qu'il nous a apporté.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques vétérinaires pour leur aide, leur gentillesse et leur aimabilité. Merci IMEN, TINHINENE, WARDA et surtout ami ABDELKADER.

Nous remercions aussi l'ensemble du personnel du laboratoire de contrôle qualité des produits biologiques à l'institut Pasteur d'Algérie pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide et surtout docteur ALOUACHE Mounia, merci infiniment.

Sans oublier monsieur AMROUNI directeur de la cellule biosécurité, bio-sûreté/hygiène et sécurité à l'institut Pasteur d'Algérie pour toute l'aide qu'il nous a apporter.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de la doctorante SAADOUNE Zineb qui nous a aidé dans la réalisation de la pratique de cette étude, nous la remercions pour son aide, sa présence, sa gentillesse et sa bonne humeur. Merci ZINEB.

**Cordialement *AMINA et RIMA***

## **DEDICACES**

Je dédie ce modeste travail :

### **À mes parents,**

Qui ont su me donner les ailes nécessaires pour réussir mon envol dans la vie, tout en sachant la peine qu'ils auraient le jour de me voir partir au loin.

En remerciement de ce beau geste, ce mémoire leur est dédié.

### **A ma mère,**

Pour son aide inestimable, qu'elle soit humaine ou scientifique, pour ce mémoire ou dans ma vie, pour ses conseils dont je ne regrette jamais l'application, pour son amour, pour ses encouragements, pour son dévouement et pour avoir réussi à être encore mon modèle

### **A mon père,**

Pour son soutien indéfectible, source de sacrifice, qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

Puisse dieu vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

### **A mon frère,**

Hocine, pour savoir me faire rire, pour être une oreille quand J'ai besoin d'écoute, pour être une épaule quand je suis fatiguée, pour être un ami quand j'ai besoin de conseil.

Une spéciale dédicace à une personne qui a été toujours là pour me soutenir, m'aider et m'écouter. Ma chère amie et sœur, mon binôme Rima merci pour ton amour, ton amitié, et que Dieu te protège et te procure joie et le bonheur que tu mérites et que notre amitié reste à jamais.

### **A toute ma famille BRAHIMI et ARBAOUI.**

A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

*Brahimi Amina*

Je ne trouve aucun mot ou expression, qui vont exprimer mes vifs sentiments de gratitude et remerciements

Je dédie ce travail :

### **A ALLAH LE TOUT PUISSANT**

Oh ! Mon seigneur, Tu m'as fait trébucher pour me permettre de mieux apprécier ta grandeur. Gloire à Toi ! Nous n'avons dû savoir que ce que Tu nous as appris. Certes c'est Toi L'Omniscient, Le Sage. [Sourate 1 versé : 32.]

### **A mes très chers parents**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel, ma considération et ma gratitude pour les innombrables sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me porter depuis mon enfance, Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux formulé, bien que je ne vous acquitte jamais assez. Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie.

### **A la mémoire de mon père**

Ce travail est dédié à mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussée et motivé dans mes études.

J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de ta fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

### **A ma mère**

« Tu m'a donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tous ce que je peux offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée. »

### **A mon cher petit frère Amine**

Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux, Je te dédie ce travail.

Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous tes vœux.

### **A ma confidente : ma binôme Amina**

Conserve-moi ta profonde amitié et ton immense amour et sois convaincue qu'il en est de même pour moi.

Je sais que tu es là, jamais je ne t'oublierai puisque je te dois beaucoup d'affection et amour !

À TOUTES LES PERSONNES QUI ONT PARTICIPÉ A L'ÉLABORATION DE CE TRAVAIL  
À TOUS CEUX QUE J'AI OMIS DE CITER

**Bennani Rima**

## TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATION

INTRODUCTION ..... 15

### CHAPITRE I: PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I.	L'INFLAMMATION INTESTINALE.....	17
I.1	Historique.....	17
I.2	Définition.....	17
I.3	Les formes de maladie inflammatoire de l'intestin.....	18
I.3.1	La maladie de crhon.....	18
I.3.2	La colite ulcéreuse.....	18
I.4	Symptômes.....	19
I.5	Diagnostic.....	19
I.6	Approches thérapeutiques de la colite ulcéreuse.....	20
I.6.1	Approche médicamenteuse.....	20
I.6.2	Approche chirurgicale.....	21
I.6.3	Produits biologiques.....	21
II.	LES POLYPHENOLS.....	22
II.1	Généralités.....	22
II.2	Classification et structure des polyphénols.....	23
II.2.1	Les acides phénoliques.....	23
II.2.2	Les flavonoïdes.....	23
II.2.3	Les stilbènes.....	24
II.2.4	Les lignanes.....	24
II.3	Les polyphénols du raisin.....	24
II.3.1	Les flavonoïdes.....	25
II.3.2	Autres composés phénoliques.....	26
II.4	Les polyphénols de marc de raisin rouge.....	27
III.	LES POLYPHENOLS ET L'INFLAMMATION INTESTINALE.....	28
III.1	Généralités.....	28
III.2	Effets des polyphénols in vitro.....	28



III.3	Effets des polyphénols sur différents médiateurs de l'inflammation.....	29
III.4	Biodisponibilité des polyphénols .....	29
III.4.1	Absorption intestinale .....	30
III.4.2	Mécanisme des polyphénols .....	30
IV.	L'ENCAPSULATION.....	33
IV.1	Généralité .....	33
IV.2	Types et caractéristiques de la micro-encapsulation.....	33
IV.3	Application de la micro-encapsulation.....	36
IV.4	Objectifs de la micro-encapsulation.....	37
IV.5	Avantages et inconvénients.....	38
IV.6	Mécanisme de libération du principe actif à partir des microcapsules .....	38

## **CHAPITRE II: PARTIE MATERIELS ET METHODES**

I.	MATERIELS.....	41
I.1	Matières premières utilisées .....	41
I.2	Matériel biologique .....	42
I.3	Matériels non biologiques .....	43
II.	METHODES .....	43
II.1	Extraction des composés phénoliques.....	43
II.2	Analyses phytochimiques d'extrait phénolique .....	44
II.2.1	Dosage des polyphénols totaux.....	44
II.3	Evaluation de l'activité antioxydante.....	45
II.3.1	Mesure de pouvoir de piégeage du radical DPPH .....	45
II.4	Formulation des microbilles de polyphénol.....	45
II.5	Etude de dissolution in vitro des formulations.....	47
II.5.1	Principe de la méthode.....	47
II.5.2	Le protocole expérimental .....	48
II.5.3	Dosage du PA par spectroscopie UV-Visible.....	48
II.6	Test de dissolution.....	48
II.7	Caractérisation des billes gélifiées .....	49
II.7.1	Mesure du taux de gonflement.....	49
II.7.2	Mesure de la densité .....	49
II.7.3	Taux d'humidité.....	50
II.7.4	Analyse infrarouge.....	50

II.8	Morphologie des microbilles gélifiées .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
II.8.1	Observation en microscopie optique.....	50
II.9	Etude de la stabilité des microbilles.....	50
II.9.1	Stabilité chimique .....	50
II.9.2	Stabilité physique.....	51
II.9.3	Stabilité mécanique.....	51
III.	ETUDE IN VIVO DE L'INFLAMMATION INTESTINALE .....	52
III.1	Méthode d'induction de la rectocolite ulcéro-hémorragique.....	52
III.2	Mode d'administration du médicament .....	53
III.3	Etude de l'évolution pondérale .....	54
III.4	Analyse clinique.....	54
III.5	Sacrifice et prélèvement des organes .....	54
III.6	Analyse histopathologique .....	55
III.6.1	La fixation des organes prélevés.....	55
III.6.2	Examen macroscopique et mise en cassettes .....	55
III.6.3	Déshydratation et éclaircissement .....	56
III.6.4	Inclusion.....	57
III.6.5	La microtomie.....	58
III.6.6	Coloration des lames.....	59

### **CHAPITRE III: PARTIE RESULTATS ET DISCUSSIONS**

I.	CARACTERISTIQUES DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	60
I.1	Analyse par spectrophotométrie IR-TF.....	60
I.2	La teneur des polyphénols.....	61
I.3	Activité antioxydante .....	62
II.	FORMULATION DES MICROBILLES.....	63
II.1	Dosage du bain CaCl <sub>2</sub> .....	63
II.2	Mécanisme de la formulation (la sphérification) .....	64
II.3	Test de maturation des microbilles .....	65
III.	TEST DE DISSOLUTION .....	66
III.1	Effet de la proportion d'alginate de sodium.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
IV.	CARACTERISATIONS DES MICROBILLES.....	68
IV.1	Densité, taux d'humidité, taux de gonflement .....	68
IV.2	Analyse par spectrophotométrie IR-TF.....	69

IV.3 Morphologie des microbilles.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
IV.3.1 Observation par microscope optique .....	70
IV.4 Test de stabilité .....	71
IV.4.1 Stabilité chimique .....	71
IV.4.2 Stabilité thermique .....	72
IV.4.3 Stabilité mécanique.....	72
V. ANALYSES CLINIQUES .....	75
V.1 Symptomatologie et comportement des animaux .....	75
V.2 L'évolution pondérale des souris .....	75
V.3 L'évolution pondérale et la longueur du colon .....	77
VI. Étude histologique .....	79
CONCLUSION	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

## LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCUH [12].	18
Figure I.2 : Aspect anatomopathologique de la maladie de Crohn et de la RCUH. [14]	19
Figure II.1 : Structures chimiques des différentes classes de polyphénols [32].	23
Figure II.2 : Composition qualitative en polyphénols dans le raisin [42].	25
Figure IV.1 : Illustration des caractéristiques des polyphénols encapsulés produite par plusieurs méthodes d'encapsulation [83].	34
Figure IV.2 : Schéma et image MEB de microcapsules.	35
Figure IV.3 : Schéma et MEB de microsphères.	35
Figure I.1 : Structure chimique de la sulfasalazine	42
Figure I.2 : Photos numérique montrant l'élevage des souris au sein de l'animalerie	42
Figure II.1 : Les Etapes de l'extraction.	44
Figure II.2 : Les Etapes de la formulation.	47
Figure III.1 : Photo numérique montrant la méthode d'induction de la rectocolite ulcéro-hémorragique par voie rectale.	52
Figure III.2 : Photo numérique montrant la pesé des souris.	54
Figure III.3 : Photos numérique montrant la préparation du matériel biologique pour l'expérimentation.	54
Figure III.4 : La Conservation des organes dans le formol à 4%.	55
Figure III.5 : Coupe et mise en cassettes des tissus.	56
Figure III.6 : Photos numérique montrant la déshydratation à l'aide d'un automate.	57
Figure III.7 : A : Station d'enrobage ; B : Les Etapes d'inclusion.	58
Figure III.8 : Photos numérique montrant les étapes de la microtomie.	58
Figure III.9 : Photos numérique montrant la coloration et montage des lames.	59
Figure I.1 : Spectre IR-TF d'extrait phénolique du marc de raisin	60
Figure I.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	61
Figure I.3 : Activité antioxydante de l'extrait et de BHA.	62
Figure II.1 : Solution du bain $\text{CaCl}_2$ après le dosage	63
Figure II.2: Exemple d'enchaînement des blocs GG, blocs MM ou blocs alternés MG dans une chaîne d'alginate.	64
Figure II.3 : Mécanisme de remplacement des ions	64
Figure II.4 : Géométrie tridimensionnel "boîte à œufs"	65
Figure II.5 : Cinétique de gélification des microbilles contenant du polyphénol	66
Figure III.1 : Cinétiques de libération du PA à partir de différentes concentrations d'alginate à pH=6,8 et T=37°C.	67

Figure IV.1: Spectre FT-IR des microbilles d'alginate.....	69
Figure IV.2: Spectre FT-IR des microbilles d'extrait phénolique encapsulé dans l'alginate .....	70
Figure IV.3 : Photographies optique des microbilles gélifiées .....	70
Figure IV.4 : Effet du pH sur la stabilité chimique des différentes doses de microbilles.....	72
Figure IV.5 : Variation de G' et G'' en fonction du cisaillement .....	73
Figure IV.6 : Variation de G' et G'' en fonction de la fréquence température. ....	74
Figure V.1 : Evolution du poids des souris traités par les différentes formulations en comparant avec le médicament de référence pendant 7jours.....	76
Figure V.2 : Variations pondérales du colon .....	77
Figure V. 3 : Variations de la longueur du colon.....	77
Figure V. 4 : Variations Pondérale du système digestif.....	78
Figure V. 5 : Variations de la longueur du système digestif.....	78
Figure VI.1 : Coupe histologique du colon de la souris témoin négatif.....	79
Figure VI.2 : Coupe histologique du colon de la souris témoin positif.....	80
Figure VI.3 : Coupe histologique des colons des souris traitées avec le médicament de référence. ....	82
Figure VI.4 : Coupe histologique des colons des souris traitées avec 10mg du polyphénol. ....	83
Figure VI.5 : Coupe histologique des colons des souris traitées avec 16.5mg du polyphénol. ....	85
Figure VI.6 : Coupe histologique des colons des souris traitées avec 23mg du polyphénol. ....	86

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau IV.1: Exemples d'application de la micro-encapsulation dans de nombreux domaines industriels.[86].....	36
Tableau I.1: Les principales caractéristiques d'alginate de sodium .....	41
Tableau I.2 : Identification et propriétés chimiques de la sulfasalazine ...	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Tableau II.1 : Proportion de formulation des microbilles proposée par le mode 6. ....	46
Tableau III.1 : La nature des traitements reçus par les différents lots .....	53
Tableau III.2 : Les quantités journalières des différentes concentrations du polyphénol....	53
Tableau III.3 : Le Programme de circulation au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques vétérinaires. ....	57
Tableau I.1: Activité 50% d'inhibition .....	63
Tableau IV.1 : Caractéristiques de différentes microbilles préparées. ....	68

## LISTE DES ABREVIATIONS

- AA%** : Activité antioxydant
- A<sub>bs</sub>** : Absorbance
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ARN** : Acide ribonucléique
- ATP** : Adénosine-triphosphate
- BHA** : L'hydroxyanisole butylé
- CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium
- CH<sub>3</sub>COOH** : acide acétique
- CI50%** : La concentration inhibitrice médiane
- DPPH** : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
- EAG** : Equivalent de l'acide gallique
- EGCG** : Epigallocatechine galate
- FCS** : Formule sanguine complète
- FT-IR** : Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier
- G%** : Taux de gonflement
- H%** : Taux d'humidité
- HE** : hématoxyline-éosine
- IRM** : Imagerie par résonance magnétique
- MC** : Maladie de Crohn
- MEB** : Microscope électronique à balayage

**MICI** : Maladies inflammatoire chronique de l'intestin

**MII** : Maladie d'inflammatoire intestinale

**MMP** : Metalloproteinases matricielles

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**PA** : Principe actif

**pH** : Potentiel d'hydrogène

**RCH** : Rectocolite hémorragique

**RCUH** : Rectocolite ulcéro- hémorragique

**TNF $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumoral

**UV** : Ultra-violet

**$\lambda_{max}$**  :Longueur d'onde maximale



## INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales sont des maladies multifactorielles dues à une réponse immunitaire inappropriée chez des individus génétiquement prédisposés, résultat d'une interaction complexe entre facteurs environnementaux et microbiote intestinal [1]

La rectocolite est une maladie chronique idiopathique inflammatoire qui affecte exclusivement le colon et le rectum, caractérisée par une diarrhée et des saignements rectaux [2]. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été adoptées : l'acide 5-aminosalicylique, les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les thérapies biologiques représentées par l'infliximab [3]. Cependant, considérant le fait que ces approches thérapeutiques engendrent des effets indésirables et des complications plus ou moins sévères à long terme [4,5]. Pour cela, la valorisation des ressources naturelles pour combattre ce type de maladie est la préoccupation des chercheurs qui sont toujours à la recherche des biomolécules naturelles qui ont moins d'effets indésirables que les médicaments mais dotés du même effet thérapeutique. C'est pourquoi nous nous sommes intéressées dans ce mémoire aux composés phénoliques extraits du marc de raisin.

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.

La richesse documentaire et les nombreuses expérimentations menées ont permis de confirmer les bienfaits de ces molécules végétales, notamment leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et antivirales. Des études cliniques et épidémiologiques ont démontré leur efficacité dans la lutte contre certains cancers, les maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives, les diabètes et l'ostéoporose. Ces propriétés ont pu être mesurées in vitro. [6]

Néanmoins, le goût d'astringence et l'instabilité des polyphénols limitent son utilisation. Des solutions techniques comme la microencapsulation qui consiste à vectoriser les médicaments vers leur site d'absorption, ou encore mieux, vers leur site d'activité. La

microencapsulation est une technique envisageable qui offre la possibilité de masquer le goût des polyphénols, d'optimiser leur assimilation par l'organisme et d'améliorer la conservation de leurs propriétés au cours du procédé de fabrication et du stockage en utilisant un enrobage des principes actifs ou des particules par des membranes protectrices [7]

Dans cette étude nous nous sommes intéressées à la microencapsulation de l'extrait phénolique du marc de raisin, afin de préserver les polyphénols et d'adapter ce matériau précieux aux usages pharmaceutiques.

Pour se faire, nous avons procédé à l'élaboration des microcapsules puis à l'évaluation de l'efficacité de la micro-encapsulation dans 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.

## **I. L'INFLAMMATION INTESTINALE**

### **I.1 Historique**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) désignent des lésions inflammatoires, d'étiologie peu connue, atteignant le tractus digestif. Ces atteintes sont définies par des manifestations cliniques variées et souvent, comme leur nom l'indique, en évolution chronique, c'est à dire avec une succession de phases de rémissions et de poussées de la maladie. Les lésions inflammatoires sont secondaires à une activation du système immunitaire intestinal en amont duquel l'implication de facteurs environnementaux (mode de vie, flore intestinale, virus) et génétiques (prédisposition héréditaire) commence à être mieux connue. La maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH) sont les deux principales formes de MICI. La MC fut découverte par Fabry en 1623 et décrite pour la première fois par Antoni Lesniowski en 1904. En 1932, après avoir décrit 14 cas d'une affection alors appelée « iléite terminale ou régionale » et localisée à la moitié terminale de l'iléon, le gastro-entérologue Burrill Crohn, donna son nom à cette pathologie. La RCH fut différenciée de la dysenterie bactérienne en 1859 par Samuel Wilks puis décrite par Arthur Hirst en 1931. Bien que la MC et la RCH présentent un phénotype clinico-pathologique similaire, ces deux pathologies diffèrent par la localisation de l'inflammation dans le tube digestif et la nature des atteintes histologiques [8].

### **I.2 Définition**

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) représentent un groupe de maladies idiopathiques caractérisées par une inflammation chronique de l'intestin. Ce groupe correspond à deux grandes affections : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ces deux affections comportent des caractéristiques cliniques et pathologiques distinctes mais il existe également un certain chevauchement [9].

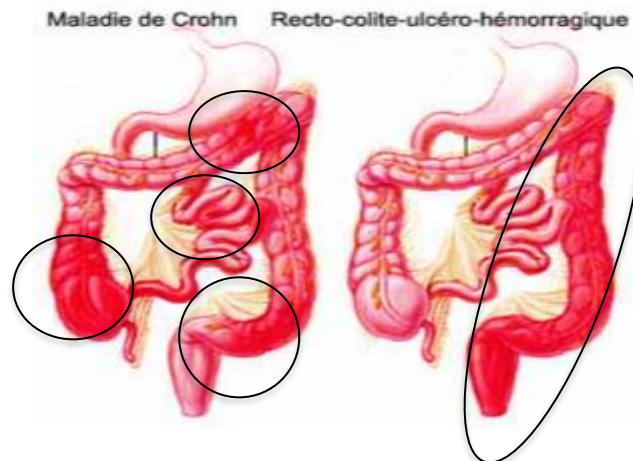
La pathogénèse des MICI n'est que partiellement connue à ce jour. Des facteurs génétiques et environnementaux telle qu'une modification de la flore bactérienne intraluminaire et une perméabilité intestinale accrue jouent un rôle dans la dérégulation de l'immunité intestinale, avec pour effet des lésions gastrointestinales [10].

### **I.3 Les formes de maladie inflammatoire de l'intestin**

#### **I.3.1 La maladie de Crohn**

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique du système digestif, qui évolue par poussées (ou crises) et phases de rémission. Elle se caractérise principalement par des crises de douleurs abdominales et de diarrhée, qui peuvent durer plusieurs semaines ou plusieurs mois. Fatigue, perte de poids et même dénutrition peuvent survenir si aucun traitement n'est entrepris. Dans certains cas, des symptômes non digestifs, qui touchent la peau, les articulations ou les yeux peuvent être associés à la maladie.

En cas de maladie de Crohn, l'inflammation peut toucher n'importe quelle partie du tube digestif, de la bouche à l'anus. Mais le plus souvent, elle s'installe à la jonction de l'intestin grêle et du côlon (gros intestin) (Figure I.1) [11].



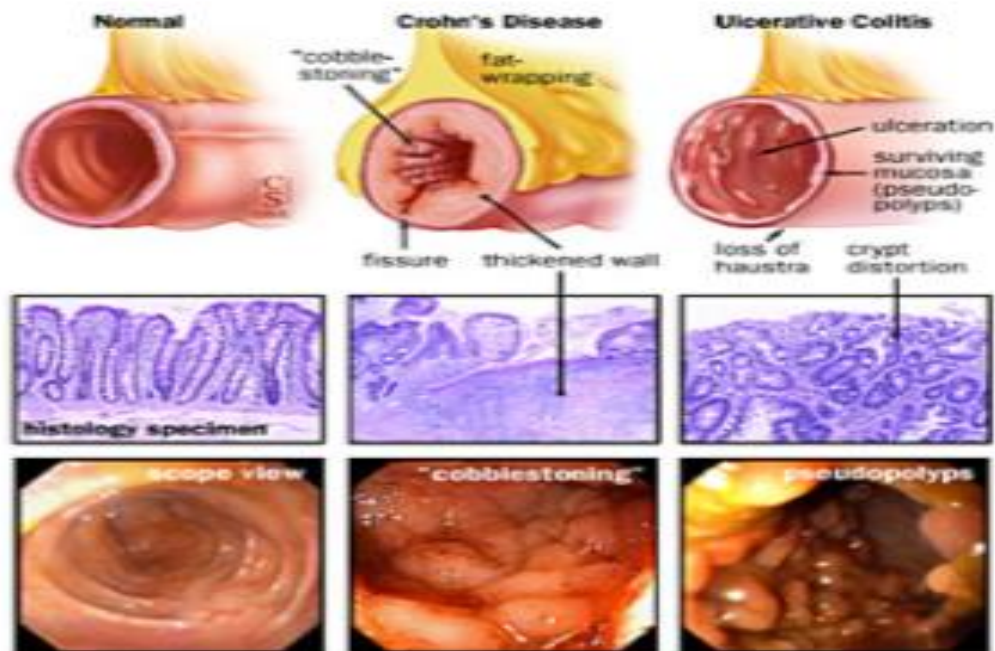
**Figure I.1 : Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCUH [12].**

#### **I.3.2 La colite ulcéreuse**

La RCH est une affection chronique caractérisée par une inflammation diffuse de la muqueuse colique. Elle touche le rectum dans 95 % des cas et peut s'étendre en proximal de façon symétrique, circonférentielle, sans interruption pour toucher une partie ou la totalité du colon. Les signes cliniques cardinaux de la RCH sont représentés par la diarrhée glairo sanglante souvent avec un syndrome rectal proéminent fait de ténésme et de faux besoins.

L'évolution de la maladie est faite de poussées entrecoupées de rémissions pouvant survenir spontanément ou en réponse au traitement. La RCH touche environ 500.000

personnes au Etats-Unis avec une incidence de 8 à 12 nouveaux cas par 100.000 habitants par an [13].



**Figure I.2 : Aspect anatomopathologique de la maladie de Crohn et de la RCUH.**  
[14]

#### **I.4 Symptômes**

La RCH se manifeste principalement par des « crises » (poussées), avec des selles abondantes et fréquentes (diarrhées), dont la sévérité et la fréquence sont très variables d'un malade à l'autre et dépendent de l'étendue de l'inflammation. Celle-ci peut se limiter au rectum (on parle alors de rectite) et à l'anus (proctite), ou s'étendre à une partie plus ou moins importante du côlon (colite). L'atteinte peut être limitée à la partie gauche du côlon ce qui entraîne de l'ordre de 4 à 6 selles par jour alors qu'une atteinte étendue à la totalité du côlon (on parle de pancolite) entraîne jusqu'à 15 à 20 selles par jour [15-16].

#### **I.5 Diagnostic**

Pour diagnostiquer la maladie de l'inflammation de l'intestin, le médecin doit passer par plusieurs tests cliniques mais les plus importants sont l'endoscopie et l'anatomopathologie.

### a. Tests cliniques

L'examen clinique comporte une anamnèse détaillée à la recherche des symptômes de la pathologie (douleurs abdominales, diarrhée, Antécédents familiaux...), analyses sanguines pour détecter l'inflammation (FSC) et analyses des selles.

### b. Imagerie et endoscopie

Elle consiste à effectuer des images du colon prises par :

- Radiographie abdominales.
- Scanner ou bien IRM.
- Coloscopie.

### c. Anatomopathologie

Elle se divise en deux gros examens qui sont :

- Examen macroscopique : c'est l'observation du colon à l'œil nu pour détecter les différents types de lésions.
- Examen microscopique : se fait sous microscope pour chercher les lésions de type inflammatoire.

### d. Examen proctologique

Pour détecter les fissures, les ulcères .....

### e. Entéroscopie

C'est un test complémentaire se fait par vidéocapsule sur l'intestin grêle [17].

## I.6 Approches thérapeutiques de la colite ulcéreuse

Les stratégies thérapeutiques de la RCUH regroupent des produits pharmacologiques et des interventions chirurgicales. Elles sont adaptées aux malades selon l'étendue des lésions et la sévérité des poussées.

### I.6.1 Approche médicamenteuse

Plusieurs molécules ont été proposées dans le traitement de la RCUH dont les effets sont suspensifs et non curatifs. La première approche implique les anti-inflammatoires

représentés par les salicylés traitant les formes légères de la colite ulcéreuse. Le plus souvent prescrit est la salazopyrine® (sulfasalazine) [18,19].

Cependant, de multiples effets indésirables lui sont associés tels que : des insuffisances rénales, des vomissements, des diarrhées, des troubles hématologiques et même des effets sur la fonction sexuelle [20].

Dans les formes les plus sévères, l'inflammation peut être contrôlée par des corticoïdes. En cas d'une cortico-résistance ou une cortico-dépendance, un traitement à activité immuno-modulatrice (l'azathioprine) pourrait être envisagé. D'autres traitements biologiques tels que les anticorps dirigés contre le TNF $\alpha$  représentent la nouvelle vague thérapeutique la plus efficace et la plus coûteuse [21- 23].

### **I.6.2 Approche chirurgicale**

Le traitement chirurgical est proposé en dernière intention chez les patients en cas de complication ou de résistance au traitement médical, d'une colite aiguë grave, ou encore lors d'un risque accru d'un cancer colorectal. Son principe repose sur l'ablation d'une partie du côlon et/ou du rectum malade ou susceptible de le devenir [24, 25].

Les limites d'utilisation et les effets secondaires rencontrés lors de ces approches constituent un problème majeur de santé publique, ce qui a orienté les chercheurs vers un autre angle que les préparations à base de substances chimiques, et les a amenés à faire plutôt recours aux substances naturelles : la « phytothérapie » [26, 27].

### **I.6.3 Produits biologiques**

Les médicaments biologiques constituent une option importante dans le traitement de la MII modérée à grave. Ces produits sont des anticorps mis au point pour des indications précises : ils bloquent de façon sélective les molécules jouant un rôle dans le processus inflammatoire. Les gastro-entérologues prescrivent couramment des médicaments biologiques, notamment l'infliximab (Remicade®), l'adalimumab (Humira®), le golimumab (Simponi®), le vedolizumab (Entyvio®), l'ustekinumab (Stelara®), et plus récemment, un biosimilaire de l'infliximab (Inflectra®), afin de contrôler les symptômes (induire une rémission clinique) des maladies inflammatoires de l'intestin [28].

## II. LES POLYPHENOLS

### II.1 Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux. Ils participent aux réactions de défense des végétaux face à différents types de stress (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique et nutritionnelle des aliments d'origine végétale. Les composés phénoliques sont des molécules comportant au moins un noyau aromatique porteur d'un ou plusieurs groupements hydroxyles.

Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues et parmi elles, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ces composés sont repartis en différentes classes définies en fonction du nombre de noyaux aromatiques et de la structure de leur squelette carboné : 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 une catégorie de molécules organiques largement répandues dans le règne végétal et dans nos aliments. Ils forment une famille étendue de molécules biologiques jouant un rôle protecteur chez les plantes avec une grande variété structurale allant de composés contenant un simple noyau phénolique (acide phénolique) à des composés polymériques complexes comme les tanins.

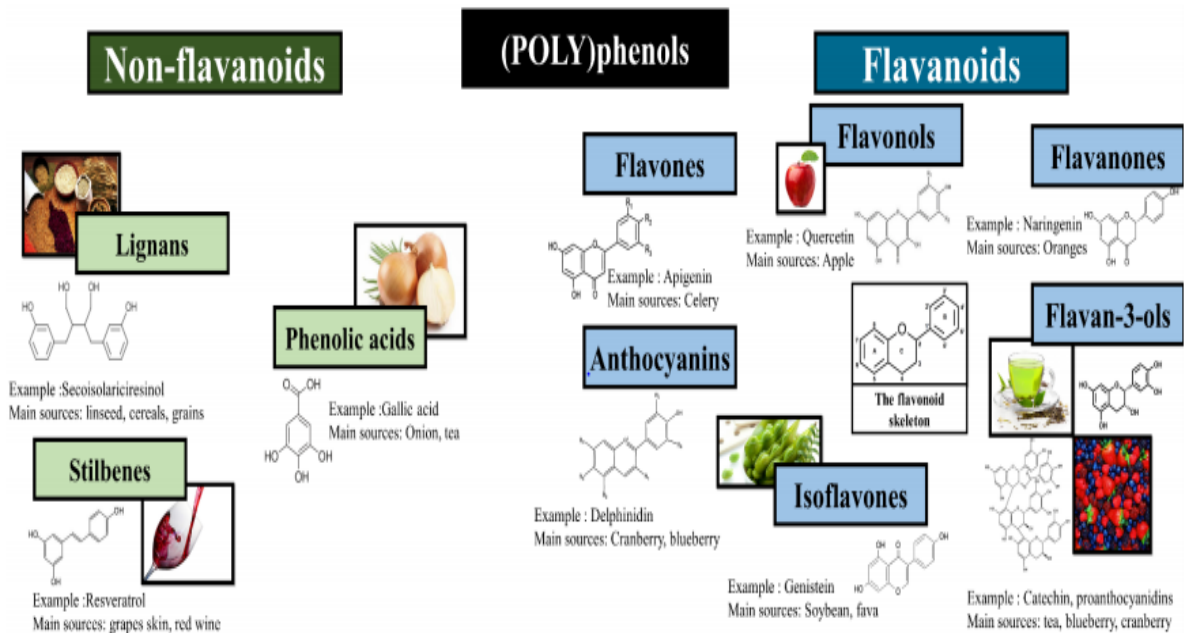
Tous les composés phénoliques végétaux proviennent d'un intermédiaire commun, la phénylalanine ou un précurseur proche, l'acide shikimique. Ces molécules sont caractérisées par une structure chimique commune, constituée d'au moins un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles.

L'association avec d'autres composés, comme les acides carboxyliques et organiques, les amines, les lipides et les liaisons avec d'autres phénols sont également fréquents et confèrent aux polyphénols de multiples propriétés et de nombreux bienfaits pour la santé.

Ils sont classés en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et des éléments structuraux qui lient les cycles les uns aux autres. [29 - 31]

Ils se divisent en 3 principales classes présentées dans la figure II.1 ci-après.





**Figure II.1 : Structures chimiques des différentes classes de polyphénols [32].**

## **II.2 Classification et structure des polyphénols**

### **II.2.1 Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques regroupent les acides hydroxybenzoïques présentant une structure de base de type C6-C1 et les acides hydroxycinnamiques dont la formule de base est en C6-C3. Les acides hydroxybenzoïques les plus répandus sont l'acide gallique et l'acide salicylique. Les acides hydroxycinnamiques les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique. Ils sont rarement retrouvés à l'état libre mais principalement sous forme liée (dérivés glycosylés ou esters de l'acide quinique, shikimique ou tartrique) [33, 34].

### **II.2.2 Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont les composés phénoliques les plus abondants dans le règne végétal. Ce sont des composés polyphénoliques présentant une structure en C6-C3-C6 et comportant deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et un hétérocycle oxygéné (cycle C).

La classification des flavonoïdes est basée sur les groupes fonctionnels présents au niveau du cycle C. Ils sont ainsi répartis en plusieurs sous-classes : flavones, flavonols, flavanones, flavanols, isoflavones et anthocyanes [35, 36]. La plupart des flavonoïdes sont présents sous forme glycolée [37].

### **II.2.3 Les stilbènes**

Les stilbènes ont une structure de base en C6-C2-C6. Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique. Le noyau aromatique A possède deux groupements hydroxyles en position méta et le noyau B porte des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para. Ces composés existent principalement sous forme glycosylée [35, 36].

### **II.2.4 Les lignanes**

Les lignanes sont caractérisés par une structure en (C6-C3)<sub>2</sub>. Ils sont produits par dimérisation oxydative de deux unités phénylpropanes. Ils sont principalement présents dans les végétaux sous forme libre tandis que leurs dérivés glycosylés ne constituent qu'une forme mineure [38].

## **II.3 Les polyphénols du raisin**

Chaque partie du raisin (pellicule, pulpe et pépins) a une composition qualitative et quantitative en polyphénols différente (figure 7). 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... [39, 40]. 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 [41]. Les composés phénoliques présents dans les raisins sont principalement des flavonoïdes (anthocyanes, flavanols et proanthocyanidines) et des acides phénoliques [37].

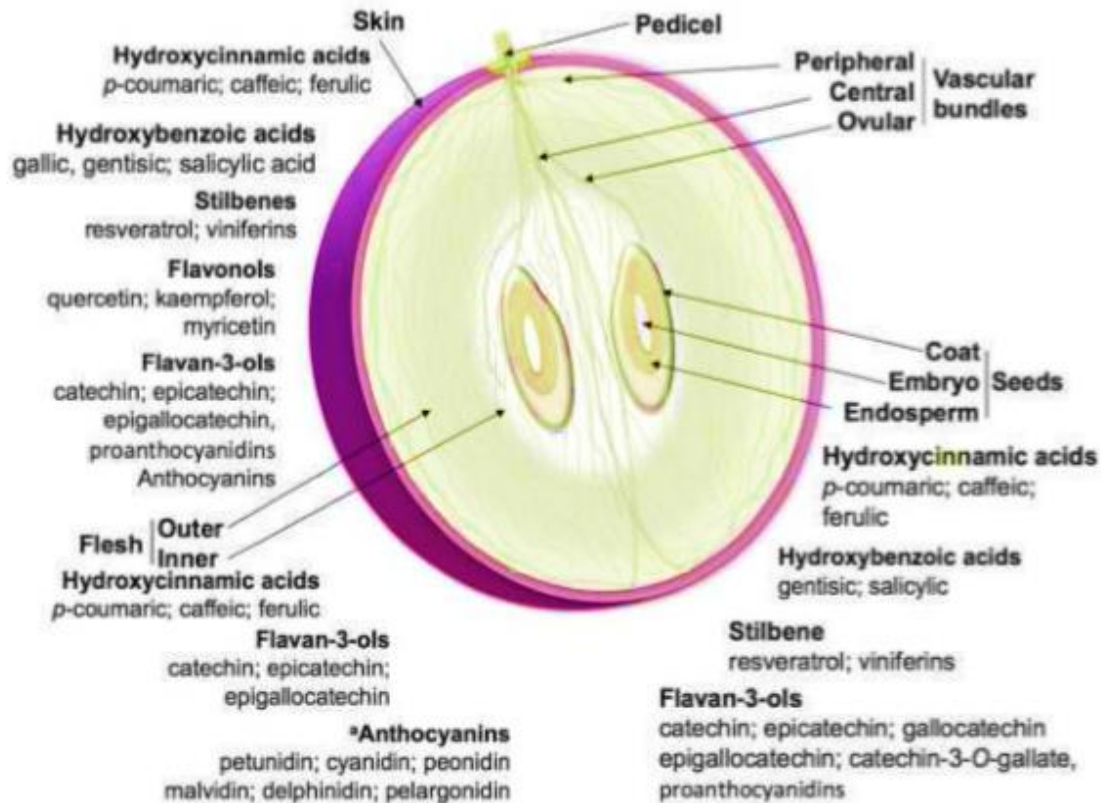


Figure II.2 : Composition qualitative en polyphénols dans le raisin [42].

### II.3.1 Les flavonoïdes

Ils sont ainsi répartis en plusieurs sous-classes :

#### a. Les anthocyanes

Ce sont les pigments rouges des variétés de raisin rouge. Les anthocyanes du raisin sont des glucosides de delphinidines, cyanidines, peonidines, petinidines et malvidines. Les anthocyanes sont présents dans les raisins à des teneurs moyennes de l'ordre de 500 à 3000 mg/kg mais ces teneurs peuvent atteindre des valeurs plus importantes pour les cépages dits << teinturiers >> comme l'Alicante (5000 mg/kg) [43]. Ils sont localisés exclusivement dans la pellicule des raisins rouges [44]. Dans le cas des cépages dits << teinturiers >>, on observe aussi une accumulation d'anthocyanes dans la pulpe. Les raisins blancs sont dépourvus d'anthocyanes [45, 46].

### **b. Les flavonols**

Les flavonols sont la deuxième classe de flavonoïdes les plus abondants dans les raisins [47] et sont uniquement présents dans la pellicule du raisin [48]. Les cultivars rouges sont souvent plus riches en flavonols que les blancs [49, 50]. Les flavonols sont présents sous forme 3-glycosylée dans le raisin mais peuvent être trouvés aussi sous forme aglycone (quercetine, kaempferol, myricetine, isorhamnetine) dans les vins à la suite de l'hydrolyse acide pendant la vinification et le stockage [51]. La teneur moyenne en flavonols du raisin varie de 10 à 285 mg/kg [37].

### **c. Les flavanols et proanthocyanidines**

Les flavanols sont les principaux composés phénoliques du raisin et sont présents sous forme de monomères (catéchine, épicatechine) mais surtout de proanthocyanidines (ou tanins condensés) [49]. Les flavanols et les proanthocyanidines s'accumulent principalement dans les pépins et les pellicules de raisin. Les proanthocyanidines sont présentes dans les raisins sous forme d'oligomères et de polymères. Les proanthocyanidines les plus abondantes sont les procyanidines. L'épicatechine est la principale unité des tanins condensés suivie par la catéchine [46]. Dans les cépages blancs, les flavanols représentent 46 à 56% des composés phénoliques totaux alors que dans les raisins rouges, ils représentent entre 13 et 30% de ces composés [46, 47].

## **II.3.2 Autres composés phénoliques**

Les composés phénoliques non flavonoidiques les plus abondants dans le raisin sont les acides phénoliques et les stilbènes [52].

### **a. Les acides phénoliques**

Les acides hydroxy cinnamiques sont les acides phénoliques les plus abondants dans le raisin. Les plus répandus sont les acides caféique, *p*-coumarique et férulique, principalement sous forme estérifiée avec l'acide tartrique. Ainsi l'acide caftarique (acide caféoyltartrique) est l'acide hydroxy cinnamique prédominant dans le raisin (jusqu'à 50% des acides hydroxy cinnamiques totaux) avec une teneur avoisinante 200 mg/kg. Ces composés sont plus concentrés (de 2 à 100 fois plus) dans la peau que dans la pulpe [43, 53-54].

Les teneurs en acides hydroxybenzoïques sont faibles dans les raisins par rapport aux acides hydroxycinnamiques. Le principal acide hydroxybenzoïque du raisin est l'acide gallique dont la teneur est comprise entre 100 et 230 mg/kg [43, 46].

#### **b. Les stilbènes**

Les stilbènes sont présents en faibles proportions dans les raisins. Les principaux stilbènes du raisin sont le resvératrol, son dérivé glucosylé : le picéide et des dimères de resvératrol (viniférines) [46, 50].

### **II.4 Les polyphénols de marc de raisin rouge**

Le marc de raisin est composé d'un mélange de pellicules, de pépins et d'une très faible quantité de parties ligneuses (tiges, pétioles, rafles). Le marc de raisin se caractérise par une teneur élevée en polyphénols due à l'extraction partielle pendant la vinification. Le marc de raisin rouge est une riche source de flavonoïdes, particulièrement de flavan-3-ols et proanthocyanidines, d'anthocyanes, et de flavonols. Il renferme également quelques acides phénoliques, notamment l'acide gallique et l'acide caftarique [55, 56]. Parmi les anthocyanes on retrouve principalement des dérivés 3-O-glucosylés de delphinidine, cyanidine, pétonidine, péonidine et la malvidine.

La malvidine 3-O-glucoside représente à elle seule 30% des anthocyanes totaux dans les pépins et 40% dans les pellicules alors que la cyanidine-3-O-glucoside ne représente pas plus de 2% des anthocyanes totaux [55]. Le marc de raisin fermenté est également très riche en tanins. Ceux-ci sont principalement composés de polymères de proanthocyanidines ainsi que d'oligomères, notamment la procanidine B1, et de monomères, notamment la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine [57]. Les flavonols, notamment la quarcétine, sont présents en quantités relativement faibles dans le marc de raisin rouge [56]. Globalement, les teneurs en polyphénols varient fortement selon les cépages et les modes de vinification [58].

### III. LES POLYPHENOLS ET L'INFLAMMATION INTESTINALE

#### III.1 Généralités

Les polyphénols exercent des effets bénéfiques vis-à-vis de nombreuses maladies chroniques (maladies cardiovasculaires, cancers...). Ces effets protecteurs ont longtemps été attribués à leur potentiel antioxydant. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence que les polyphénols possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Ces composés peuvent exercer leurs propriétés anti-inflammatoires à des niveaux multiples grâce à leur capacité à moduler l'activité de diverses enzymes et l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'inflammation. D'autre part, de nombreux polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'intestin grêle et atteignent ainsi le colon. La présence de polyphénols et de leurs produits de dégradation par la flore colique en quantité non négligeable dans le colon pourrait conduire à une action anti-inflammatoire locale. Ainsi les polyphénols pourraient jouer un rôle intéressant dans le contrôle de l'inflammation intestinale.

A l'heure actuelle, plusieurs études ont évalué les effets de polyphénols purs ou d'extraits riches en polyphénols sur l'inflammation intestinale que ce soit *in vitro* ou *in vivo* et ont montré que ces micronutriments pourraient limiter ou retarder le développement de l'inflammation intestinale [37].

#### III.2 Effets des polyphénols in vitro

Les modèles cellulaires constituent des outils adaptés aux études mécanistiques. Au cours des études *in vitro*, différentes lignées cellulaires (cellules épithéliales d'intestin ou de colon d'origine humaine telles que les lignées Caco-2, HT29 ou DLD-1 ou provenant de rongeurs telles que les cellules IEC-18) ont été utilisées pour étudier les effets au niveau cellulaire de composés phénoliques purs ou d'extraits riches en polyphénols. L'inflammation est le plus souvent induite par un seul stimulus (LPS ou IL-1 $\beta$ ) ou par un mélange de cytokines. Le polyphénol ou l'extraits riche en polyphénols est mis en présence des cellules soit avant l'administration de l'agent inflammatoire soit simultanément. Le plus souvent, les doses testées vont de 0.1 à 370  $\mu$ M pour des molécules isolées. Lorsque ces études utilisent des extraits végétaux, les concentrations finales en extraits vont de 2 à 500  $\mu$ g/mL [59].

### **III.3 Effets des polyphénols sur différents médiateurs de l'inflammation**

Les études in vitro ont montré que les polyphénols peuvent exercer des effets protecteurs en modulant la production et l'expression de différentes cytokines. Ainsi un extrait de peau de grenade et son polyphénol majoritaire, la punicalagine, induisent une diminution de l'expression d'IL6 et d'IL8 dans des cellules Caco-2 stimulées par un mélange de cytokines [60]. Des effets similaires ont été décrits pour un polyphénol du thé vert, l'epigallocatechine gallate (EGCG), ainsi que pour la génistéine [61]. La sécrétion d'IL-8 est également diminuée en présence de différents extraits riches en polyphénols (extraits de vin rouge, de canne à sucre ou de thé vert) [59, 62-63].

Au cours d'une inflammation induite in vitro, l'expression d'iNOS et de COX-2 ainsi que la production de NO et de PGE<sub>2</sub> sont augmentées [59]. Les polyphénols peuvent agir sur ces médiateurs afin de réduire l'inflammation. Ainsi, sur des cellules de cancer de colon Caco- et SW480 stimulées par le LPS, le resvératrol inhibe d'une manière dose-dépendante l'expression d'iNOS au niveau protéique et génique engendrant ainsi une diminution de la sécrétion de NO [64]. De même, un extrait de polyphénols de vin rouge diminue la production de NO dans des cellules HT-29 stimulées par un mélange de cytokines [65]. L'expression d'iNOS et la production de NO sont également diminuées en présence d'oleuropésine ou d'un extrait de thé vert [66, 67]. En présence de cellules Caco-2 stimulées par le LPS, le resvératrol induit une inhibition de l'expression de COX-2 associée à une réduction de la production de PGE<sub>2</sub> [68]. De même, un extrait de vin rouge riche en polyphénols inhibe de façon dose-dépendante l'expression de COX-2 induite par des cytokines [65]. La production de PGE<sub>2</sub> est également diminuée en présence d'extraits de grenade, de canne à sucre, de peau de pomme ou de poudre de cacao [59, 69].

Les polyphénols peuvent moduler l'expression d'autres médiateurs de l'inflammation tels que les molécules d'adhésion. Suite à une stimulation par le LPS, l'expression d'ICAM-1 par des cellules Caco-2 est augmentée. L'administration préventive d'un extrait de polyphénols de feuille d'olivier diminue l'expression de cette protéine [70].

### **III.4 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 [71].

#### **III.4.1 Absorption intestinale**

Les polyphénols sont présents dans les végétaux sous différentes formes. Sous forme d'aglycones, ils sont facilement absorbés dans l'intestin grêle. Cependant, la plupart des polyphénols sont présents dans les aliments sous forme de glycosides, d'ester ou de polymères qui ne peuvent généralement pas être absorbés sous forme native [38]. Ainsi, avant d'être absorbés, ces composés doivent être au préalable hydrolysés par des enzymes intestinales ou par la microflore colique [38, 72]. Les flavonoïdes, à l'exception des flavanols, sont le plus souvent glycosylés et la glycosylation a un impact sur l'efficacité de leur absorption intestinale. En effet, les glucides peuvent être absorbés au niveau de l'intestin grêle alors que les flavonoïdes liés à d'autres sucres (rhamnose, xylose...) sont généralement peu ou pas absorbés à ce niveau [36].

Les proanthocyanidines sont des polymères de haut poids moléculaire. Aussi, bien qu'ils soient très abondants dans notre alimentation, ils sont très mal ou non absorbés [36]. Les polyphénols non absorbés au niveau de l'intestin grêle vont atteindre le colon où ils vont être métabolisés par la microflore intestinale sous l'action de plusieurs enzymes générant ainsi des métabolites très différents selon leur structure. La microflore hydrolyse les glycosides en aglycones puis les dégrade en acides phénoliques simples [73]. Ainsi, les concentrations en polyphénols dans le colon peuvent atteindre plusieurs centaines de micromoles par litre [36].

#### **III.4.2 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 adénylate cyclases, les transcriptases inverses, les xanthines oxydases, les ARN et ADN polymérase, 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- $\kappa$ B hautement impliqué dans la réponse immunitaire pro-inflammatoire comme les cytokines (ex : TNF- $\alpha$ , 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 rétrocontrôle 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 débalancement qui entraîne l'altération des processus physiologiques [74].

### 1) Mécanisme avec l'inflammation intestinale

Les maladies inflammatoires de l'intestin se caractérisent par une inflammation chronique des tissus du tractus gastro-intestinal favorisant la formation d'ulcères pouvant causer des saignements [75].

À plus long terme, la présence de maladies inflammatoires de l'intestin augmente le risque de développer un cancer de l'intestin ou encore un cancer colorectal [76].

De nombreuses études *in vitro* ont montré les effets bénéfiques d'une grande variété de polyphénols tant sur la perméabilité de l'épithélium intestinal que sur la réponse inflammatoire traduisant ainsi le potentiel préventif et thérapeutique de ces molécules naturelles [77].

En plus des cellules eucaryotes formant les tissus intestinaux, le micro-biote symbiotique intestinal joue un rôle primordial dans le maintien de la santé intestinale. Des études récentes ont suggéré que les composés phénoliques influencent la composition de la microflore intestinale par des effets pré-biotiques sélectifs et des activités antimicrobiennes dirigées contre les bactéries pathogènes de l'intestin [78].

Les propriétés bénéfiques attribuées aux polyphénols dans les troubles gastro-intestinaux comprennent la protection contre les agents pathogènes, le renforcement des jonctions épithéliales intestinales, l'augmentation de la sécrétion du mucus intestinal et la modulation de la réponse immunitaire intestinale [79].

Les polyphénols agissent également sur les activités enzymatiques bactériennes qui augmentent la prévalence du risque global de cancer. Utilisant un modèle *in vivo* chez le rat, des chercheurs ont montré que la supplémentation intra-gastrique en resvératrol réduisait significativement plusieurs activités enzymatiques bactériennes associées à la prévalence des tumeurs coliques. L'activité enzymatique bactérienne réduite était associée à une diminution significative de l'incidence des tumeurs coliques chez les rats nourris au resvératrol par rapport aux rats témoins [80].

## IV. L'ENCAPSULATION

### IV.1 Généralité

La micro-encapsulation a été développée il y a environ 60 ans et elle est définie comme étant une technologie d'emballage des solides, des liquides, ou des matériaux gazeux dans des capsules scellées miniatures pouvant libérer leur contenu à des vitesses contrôlées dans des conditions spécifiques.

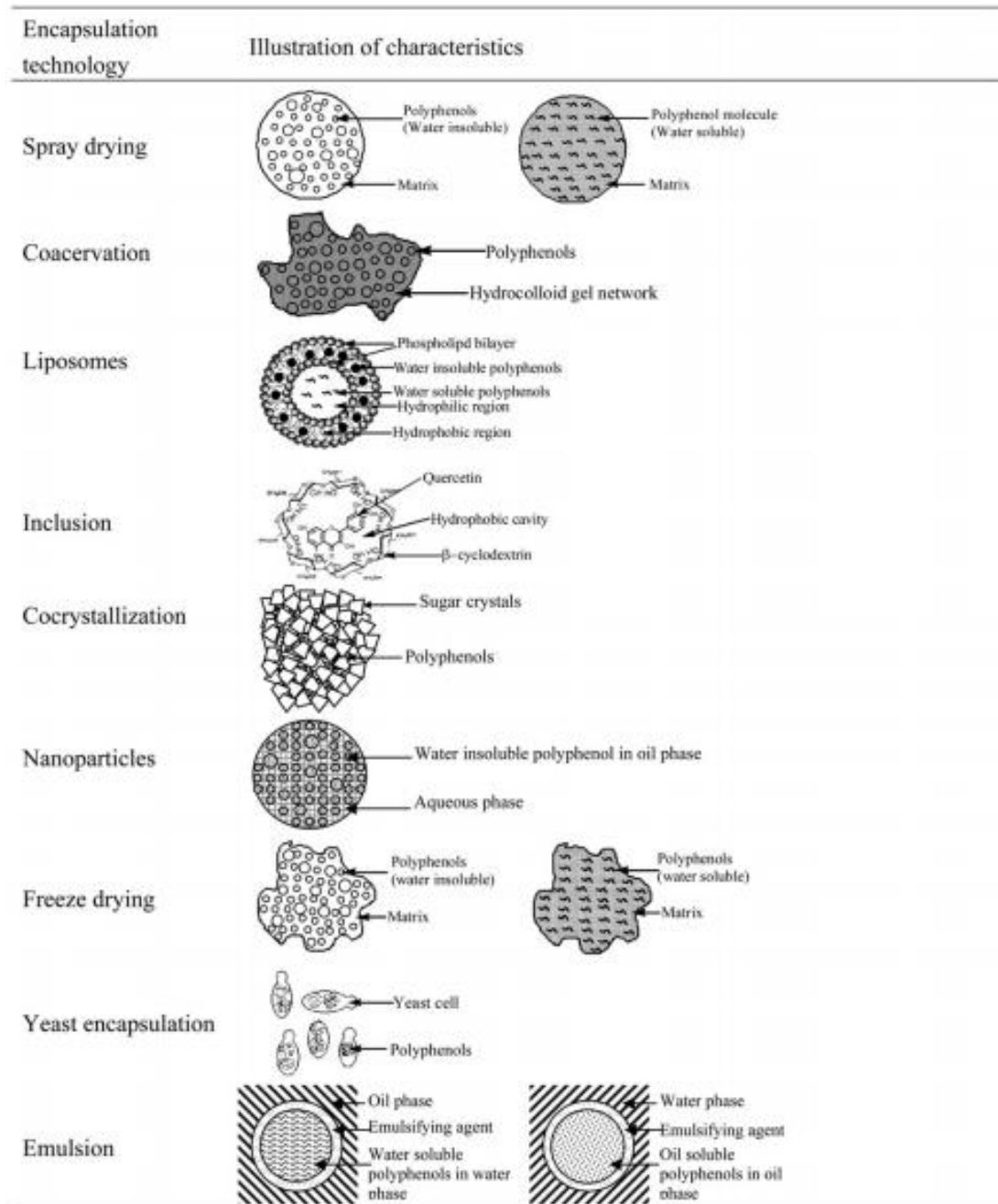
Les matériaux d'encapsulation peuvent être des matériaux purs ou un mélange, qui sont également appelés matériaux revêtus, matériaux de base, actifs, remplissage. D'autre part, les matériaux d'emballage sont appelés matériaux de revêtement, matériaux de paroi, capsules, membranes, supports ou coques, qui peuvent être constitués de sucres, gommes, protéines, polysaccharides naturels et modifiés, lipides et polymères synthétiques [81].

Les processus d'encapsulation sont généralement effectués afin de préserver la stabilité des composés bioactifs pendant le traitement et le stockage, ainsi que pour prévenir les interactions indésirables avec les matrices alimentaires, contribuant à l'augmentation de la stabilité et à la promotion d'une libération contrôlée du composé encapsulé.

Les biopolymères, tel que l'alginate de sodium, se sont révélés efficaces lorsqu'ils sont utilisés comme matériaux de revêtements, offre une efficacité élevée dans l'encapsulation des composés phénoliques extraits de plantes [82].

### IV.2 Types et caractéristiques de la micro-encapsulation

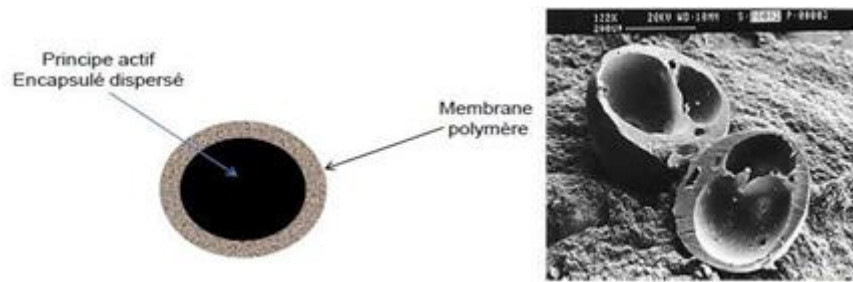
La figure IV.1 ci-dessous représente les types de la micro-encapsulation et leurs caractéristiques



**Figure IV.1 : Illustration des caractéristiques des polyphénols encapsulés produite par plusieurs méthodes d'encapsulation [83].**

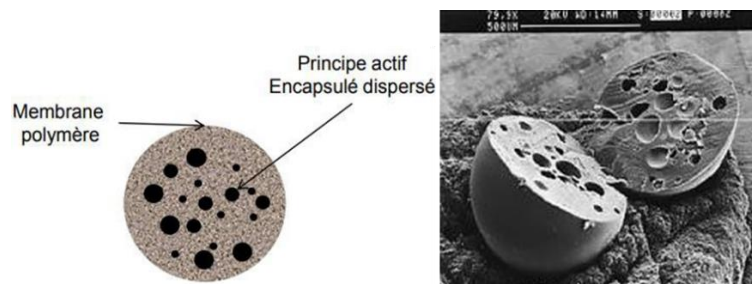
Dans ce mémoire, nous avons travaillées avec le type spray drying qui se divise en :

**-Les microcapsules :** (figure IV.2) La particule réservoir est constituée d'un cœur de matière active liquide (plus ou moins visqueux) ou solide, entourée d'une écorce solide continue de matériau enrobant. Les microcapsules ne sont pas nécessairement sphériques.



**Figure IV.2 : Schéma et image MEB de microcapsules.**

**-Les microsphères :** (figureIV.3) Un réseau macromoléculaire ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve la matière active finement dispersée, à l'état de molécules, de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions.



**Figure IV.3 : Schéma et MEB de microsphères.**

La membrane d'une microcapsule ou la matrice d'une microsphère peut se caractériser par les facteurs physico chimiques suivants :

- Charge électrique de surface.
- Mouillabilité.
- Porosité.
- Tortuosité des pores.
- Degré de gonflement.

Le taux d'encapsulation (ou la teneur en matière active) peut être très élevée dans les microcapsules, de l'ordre de 85 à 90% (rapport massique). Comparés à ceux rencontrés dans les microsphères, ils, sont plus faibles de l'ordre de 20 à 35% [84].

### IV.3 Application de la micro-encapsulation

Les matériaux micro-encapsulés sont utilisés dans l'agriculture, les produits pharmaceutiques, les aliments, les cosmétiques et parfums, textiles, papier, peintures, enduits et adhésifs, applications de toner, et de nombreuses d'autres industries [85].

Le Tableau IV.1 résume des différentes applications d'encapsulation dans de nombreux domaines industriels.

**Tableau IV.1: Exemples d'application de la micro-encapsulation dans de nombreux domaines industriels [86].**

Domaine industriel	Exemples de composés encapsulés
Pharmacie et médical	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, bactéries, vitamines, minéraux, antigènes, anticorps...
Cosmétique	Parfums, huiles essentielles, anti transpirants, agents bronzants, crèmes solaires, colorants capillaires, baumes démêlants, mousses à raser...
Alimentaire	Huiles essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, minéraux, colorants, enzymes, levures, microorganismes...
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales...
Biotechnologie	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules vivantes, cellules artificielles, cultures tissulaires, composés nutritionnels...
Chimie	Catalyseurs, enzymes, additifs pour plastiques, eau (plâtre et béton), inhibiteurs de corrosion, retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, parfums, huiles essentielles, agents lubrifiants...
Détergents	Adoucissants, antistatiques, agents décolorants, agents moussants, silicones, cires, détachants...
Textile	Colorants, parfums, pigments, bactéricides, fongicides, répulsifs d'insectes, agents antistatiques, retardateurs d'incendie, agents imperméabilisants, adhésifs, composés bioactifs médicaux, composés bioactifs cosmétiques

Graphismes et Impression	Colorants, pigments, parfums, révélateurs, cristaux liquides, toners, composés photosensibles...
Photographie	Halogénures d'argent, pigments, colorants, composés photopolymérisables, révélateurs pour photographies couleurs, plastifiants...
Electronique	Cristaux liquides, matériaux semi-conducteurs, adhésifs, agents de séchage, retardateurs de flammes, antistatiques...

#### **IV.4 Objectifs de la micro-encapsulation**

La micro-encapsulation peut être réalisée selon les points suivants :

##### **•Protection et stabilisation**

Pour protéger le matériau encapsulé contre l'oxydation ou désactivation en raison de réactions avec des espèces réactives de l'environnement. Et aussi pour protéger le manipulateur ou le consommateur

##### **•Structuration**

L'encapsulation permet aussi de structurer des composants qui sont très difficile à administrer pour plusieurs facteurs tels que l'état physique de matériel, la volatilité, la réactivité, et l'insolubilité [87]. Elle peut masquer les propriétés organoleptiques comme la couleur, le goût et l'odeur des principes actifs [88].

##### **•Libération contrôlée**

La microencapsulation peut être réalisée pour atteindre libération contrôlée / déclenchée / ciblée, pour la manipulation en toute sécurité des matières toxiques, réaliser compartimentage ou immobilisation in vitro de matériaux biologiques et de catalyseurs.

De nombreuses formulations de médicaments pour administration orale, intraveineuse, oculaire et sous-cutanée sont micro-encapsulés pour obtenir une libération contrôlée, ciblée ou déclenchée de principes actifs.

L'aspirine, par exemple, peut provoquer des ulcères peptiques et des saignements si les doses sont introduites en une seule fois.

### •Efficacité bioréacteur

La micro-encapsulation des cellules et des enzymes est utilisée pour améliorer l'efficacité des bioréacteurs puisqu'une très haute productivité volumétrique peut être obtenue, les biocatalyseurs encapsulés ont généralement plus grande stabilité thermique et opérationnelle et le traitement en aval est simplifié, car là le biocatalyseur encapsulé peut être facilement récupéré et réutilisé. En biologie moléculaire, à cellule unique, l'encapsulation est utilisée pour réaliser un criblage à haut débit dans les expériences d'évolution dirigée.

## IV.5 Avantages et inconvénients

### •Avantages

Les avantages de la micro-encapsulation sont sa commodité d'utilisation, sa réactivité retardée, la protection du principe actif, la transformation de l'aspect de la substance (passage de l'état liquide à l'état solide), la possibilité de transporter un agent thérapeutique de façon sélective sur un site donné sans oublier le faible coût du procédé [89].

Les microparticules polymériques sont plus stables que les liposomes à la fois in vivo et in vitro, ce qui permet d'obtenir une libération prolongée du principe actif, mais également durant le stockage [90].

### •Inconvénients

L'inconvénient de cette forme est que la plupart des techniques de production impliquent l'utilisation de solvants organiques dont résidus de ces solvants peuvent donc se retrouver dans les microparticules.

Et aussi le profil toxicologique de bon nombre de polymères est incertain.

## IV.6 Mécanisme de libération du principe actif à partir des microcapsules

Il existe deux modèles pour décrire, identifier et interpréter le mécanisme de libération du principe actif.

Les phénomènes physico-chimiques de transfert tels que le processus de diffusion, la dégradation ou le gonflement de la matrice, la libération par réactions chimiques sont pris en compte.



### a) Le modèle d'Higuchi [91]

Higuchi a développé différents modèles théoriques pour étudier la libération d'agents faiblement ou fortement hydrosolubles incorporés dans des matrices solides ou semi-solides. Parmi eux, la relation donnée en fonction de la racine carrée du temps a été appliquée à différents types de formulations comme les systèmes à libération transdermique et les formes matricielles comprimées (disques). Le modèle d'Higuchi est applicable en considérant que :

- Le gonflement ou la dissolution du polymère est négligeables au cours de l'essai de dissolution.
- La diffusion du principe actif de la matrice vers le milieu de dissolution est constante et dominante.

Le taux de libération est exprimé par l'équation suivante :

$$\frac{M_t}{M_i} = K_H t^{1/2} + a$$

Selon cette équation, le taux de principe actif libéré est proportionnel à la racine carrée du temps. La constante « KH », qui est fonction du coefficient de diffusion, est considérée comme une constante de libération d'Higuchi et elle est utilisée pour décrire la vitesse de libération de l'agent actif. « a » est considérée comme une constante qui peut évaluer l'effet « burst » lorsque la libération est rapide et l'effet retard lorsque la libération est lente aux premiers instants.

### b) Le modèle de Korsmeyer–Peppas [91]

Il est utilisé pour analyser la libération de formes galéniques pharmaceutiques à base de polymères, lorsque le mécanisme de libération n'est pas bien connu ou lorsque plus d'un type de phénomènes peuvent être impliqués. La valeur numérique de « n », l'exposant de libération, est utilisée afin de caractériser les différents mécanismes de libération. La valeur de « n » ne peut être déterminée que sur les premiers 60% de la libération.

$$\frac{M_t}{M_i} = K_K t^n$$

Les données de libération In-vitro sont tracées par le logarithme du pourcentage cumulé du P.A libéré en fonction du logarithme du temps.

Lorsque  $n = 0,5$ , le mécanisme de libération suit la loi de diffusion de Fick et est dépendante du temps. Si  $n$  est supérieur à  $0,5$ , la libération suit un mécanisme non Fickien ; dans ce cas plusieurs mécanismes peuvent être impliqués, la plupart du temps, une diffusion couplée à une érosion ou à des phénomènes d'hydratation et gonflement de matrices polymériques. Tandis que, lorsque  $n$  est inférieur à  $0,5$ , le mécanisme est caractérisé comme quasi-Fickien [91].

## INTRDUCTION

L'objectif de cette partie est de préparer des microbilles à base d'alginate de sodium et d'extrait phénolique et les caractériser par : spectroscopie infrarouge, microscope optique, détermination de taux d'humidité, taux de gonflement, mesure de diamètre de billes et la densité.

Cette partie comprend également une étude cinétique de libération du PA (extrait phénolique) à travers la matrice de polymère (alginate de sodium) et une étude in vivo afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire intestinal de ces microbilles.

## I. MATERIELS ET METHODES

### I.1 Matières premières utilisées

#### I.1.1 Alginate de sodium

L'alginate de sodium utilisé est de marque (ACROS ORGANICS<sup>®</sup>, medium viscosity). Ces caractéristiques sont regroupées dans le tableau (I.1)

**Tableau I.1.1: Les principales caractéristiques d'alginate de sodium**

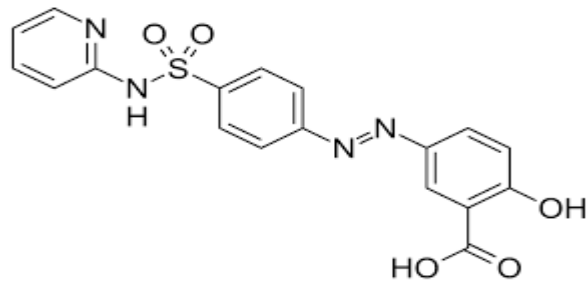
Formule brute	$C_6H_7NaO_6$
Solubilité	Peu soluble dans l'eau
Viscosité	Moyenne
Masse molaire	198,1059 g/mol

#### I.1.2 L'extrait phénolique

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.

#### I.1.3 Le médicament de référence

La sulfasalazine (commercialisée sous le nom de salazopyrine) est prescrite pour le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin, parmi lesquelles la maladie de Crohn. Elle est également indiquée pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres polyarthrites inflammatoires. (voir annexe 3)



**Figure I.1.3 :** Structure chimique de la sulfasalazine

## **I.2 Matériel biologique**

Cette étude a été réalisée sur un lot de 18 souris de type albinos dont le poids corporel est entre 25 et 30 g dans le but d'évaluer l'effet anti-inflammatoire intestinal du polyphénol extrait du marc de raisin et de la salazopyrine® *in vivo*. Les souris proviennent de l'animalerie de l'institut Pasteur d'Algérie.

Elles ont été soumises aux conditions suivantes : (Figure I.2).

- Mise en cage polystyrène.
- Accès libre à la nourriture (aliment à bouchon) et à l'eau
- Une température de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 50% d'humidité et un cycle nyctéméral qui correspond à 12h de lumière par 12h d'obscurité.



**Figure I.2 :** Photos numériques montrant l'élevage des souris au sein de l'animalerie

### **I.3 Matériels non biologiques**

Le matériel, produits, réactifs et appareils utilisés dans le cadre de cette étude sont mentionnés dans l'annexe 1, 2, 3, 4, 5 et 6.

## **II. METHODES**

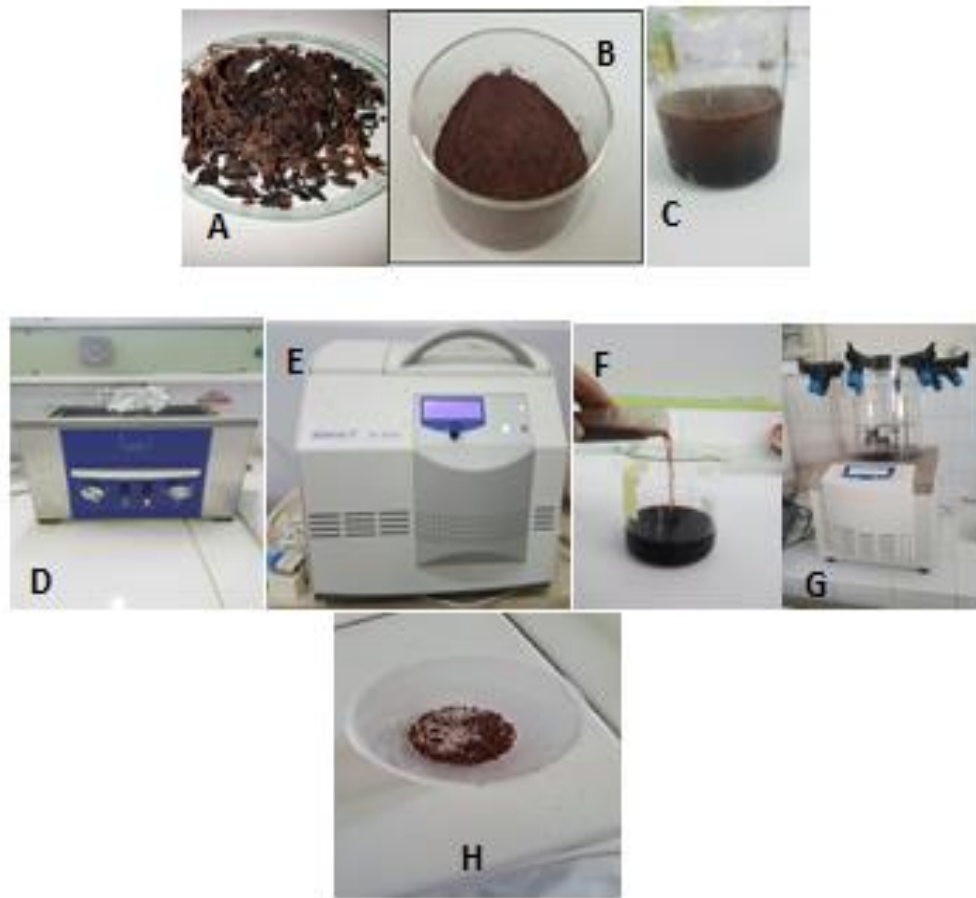
### **II.1 Extraction des composés phénoliques**

Le marc de raisin a été séché à 60° C, broyée et conservé jusqu'à l'utilisation. L'extraction assistée par ultrasons a été effectuée dans un bain ultrason.

Les échantillons de marc de raisin secs ont été placés dans un erlenmeyer contenant l'éthanol 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. ( figure II.1)

Après l'extraction, chaque échantillon a été soumis à :

- Une centrifugé.
- Elimination du solvant avec un rota vapeur.
- Lyophilisation pour éliminer l'eau.



**Figure II.1 : Les Etapes de l'extraction. A : Le Marc de raisin brut ; B : Le Marc de raisin broyé ; C : Le Mélange du marc de raisin avec le l'éthanol ; D : Mettre le Mélange dans un bain ultrason ; E : Centrifugation du mélange ; F : Récupération du surnageant ; G : Lyophilisation du liquide ; H : Le Polyphénol sec.**

## **II.2 Analyses phytochimiques d'extrait phénolique**

### **II.2.1 Dosage des polyphénols totaux**

Les polyphénols totaux des extraits ont été déterminés par la méthode de Folin-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 [92]. 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 Evaluation de l'activité antioxydante**

### **II.3.1 Mesure de pouvoir de piégeage du radical DPPH**

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre, il se caractérise par une coloration violette en état oxydé et une coloration jaune en état réduit [93]. En présence de composés antiradicalaire, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 515 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'extrait.

#### **Mode opératoire**

Un volume de 500µL de l'extrait est mélangé avec 375µL d'éthanol et 125µL d'une solution DPPH. Le mélange est incubé à température ambiante et l'abri de la lumière pendant 60 min. L'absorbance est mesurée à 517 nm. Le pourcentage d'activité antioxydant (AA%) est calculé selon la formule suivante :

$$AA(\%) = [(Abs\ blanc - Abs\ éch) / Abs\ blanc] \times 100$$

*Abs blanc* : Absorbance du DPPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon.

*Abs éch*: Absorbance de l'échantillon testé après incubation.

## **II.4 Formulation des microbilles de polyphénol**

### **a. Choix des doses**

D'après des études précédentes sur l'inflammation intestinale nous avons trouvé que plus les doses de polyphénols sont petites plus elles donnent un meilleur effet thérapeutique. La plus petite dose tester est 23mg qui a donné un effet thérapeutique contre l'inflammation intestinale [37], c'est pour cela qu'on a choisi d'utiliser cette dose et de

diminuer les doses encore plus pour voir son effet thérapeutique contre la rectocolite ulcéro-hémorragique.

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait du marc de raisin est de 200mg/mL. De cette dernière on a 0.115%, 0.0825% et 0.05%, ce qui correspond respectivement à 23mg, 16.5mg et 10mg.

### b. Préparation de la solution gélifiante :

On prépare un bain de sel de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) à 0,2M pour la mise en forme des billes.

### c. Formulation :

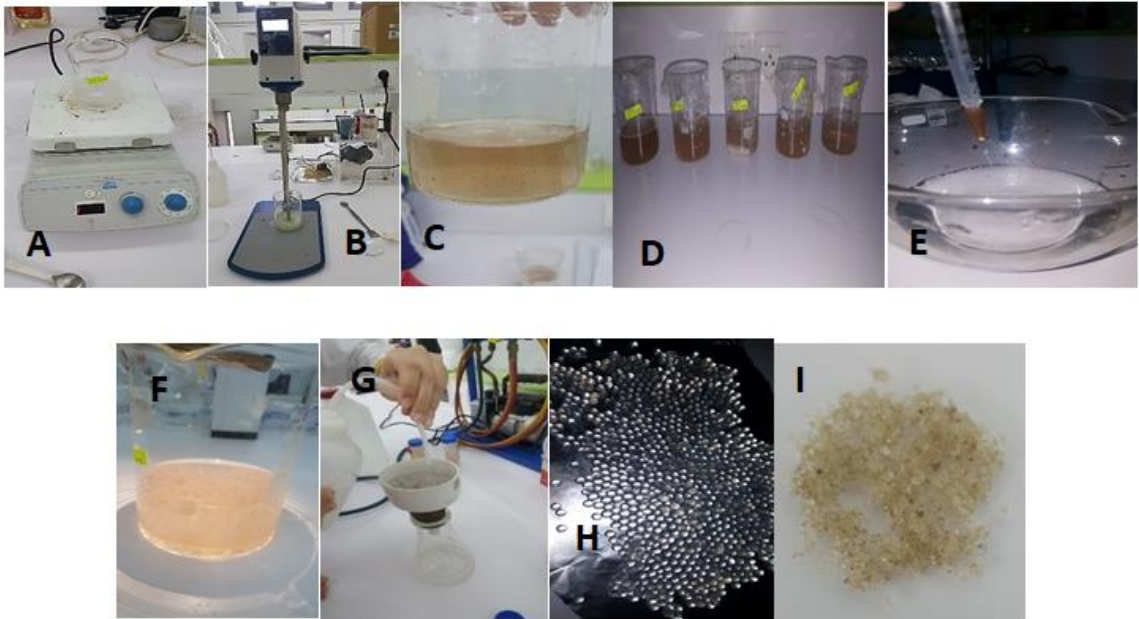
Les formulations au nombre de onze (11) ont été réalisées selon un plan d'expérience avec le mode 6 (logiciel) en variant la concentration d'alginate de 1,5% à 2% et du polyphénol de 0.05% à 0.115%.

**Tableau II.1 : Proportion de formulation des microbilles proposée par le mode 6.**

	1	2	3	4	5	6
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	alg	POLY
1	1	N1	11	Incl	▼	1,5 0,05
2	2	N2	8	Incl	▼	2 0,05
3	3	N3	9	Incl	▼	1,5 0,115
4	4	N4	4	Incl	▼	2 0,115
5	5	N5	10	Incl	▼	1,5 0,0825
6	6	N6	3	Incl	▼	2 0,0825
7	7	N7	6	Incl	▼	1,75 0,05
8	8	N8	7	Incl	▼	1,75 0,115
9	9	N9	5	Incl	▼	1,75 0,0825
10	10	N10	2	Incl	▼	1,75 0,0825
11	11	N11	1	Incl	▼	1,75 0,0825

La formulation des microbilles a été réalisée en suivant le protocole de Deladino et al. 2015 [94] avec quelques modifications. Les polyphénols sont mélangés à la solution d'alginate de sodium, une fois homogénéisé, les microbilles sont obtenues à l'aide d'une seringue dans une solution de chlorure de calcium (0,2M). Les microbilles formées ont été maintenues dans le bain gélifiant de  $\text{CaCl}_2$  afin de durcir pendant 5h. Ensuite, elles ont été lavées et filtrées sur Büchner avec de l'eau distillée. Enfin, les microbilles sont séchées à l'étuve à 70° C pendant 48h.





**Figure II.2 : Les Etapes de la formulation. A, B, C, D : Homogénéisation du polyphénol et l'alginate ; E : Synthèse des microbilles avec la seringue ; F : Les microbilles dans le bain de gélification ; G : Filtration sous vide et lavage des microbilles ; H et I : Les microbilles avant et après séchage.**

## **II.5 Etude de dissolution in vitro des formulations**

L'essai de dissolution trouve sous importance dans le contrôle d'une formulation mais aussi pour expliquer son comportement. Il est destiné à déterminer l'aptitude d'une forme galénique à laisser passer en solution, dans un milieu déterminé le principe actif qu'elle contient.

Dans le domaine des tests de dissolution, il est courant de mimer les conditions in vivo par un milieu simulé homogène in vitro, même si cela reste très éloigné de ce qui existe dans le tractus gastro-intestinal, qui est anatomiquement et physiologiquement plus complexe.

Pour permettre l'étude in vitro de la dissolution d'un principe actif, parmi les tests officiels regroupés dans les différentes pharmacopées on a la méthode à palette.

### **II.5.1 Principe de la méthode**

Le dissolu test que nous avons utilisé dans notre travail est de marque ERWEKA L'appareil est constitué de 8 bacs à fond hémisphérique d'une capacité nominale de 900 mL, dans lesquels on introduit le milieu de dissolution. Ces bacs sont placés dans un bain

d'eau thermostaté. Chaque bac est muni d'un agitateur à palette dans le but d'agiter seulement le milieu de dissolution. La couverture supérieure de l'ouverture de l'appareil est munie d'un système de commande pour le réglage de la température et de la vitesse d'agitation, et une prise de prélèvement pour chaque bac. Le prélèvement d'un échantillon dans un bac est effectué en mode manuel à l'aide d'une seringue connectée à un tube de prélèvement recouvert d'un filtre à l'extrémité plongée dans le bac.

### **II.5.2 Le protocole expérimental**

#### **Préparation du milieu tampon pH = 6,8**

50 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 M) ont été prélevés dans une fiole de 200 mL auxquels 22,4 mL d'une solution de NaOH (0,2M) ont été ajoutés et complété le volume avec de l'eau distillée, ajustez le pH si nécessaire, avec de l'hydroxyde de sodium 0,1 M ou de l'acide chlorhydrique 0,1 M.

#### **Préparation du milieu tampon pH = 1,2**

Disoudre 2g de NaCl dans une fiole de 1L auxquels 7 mL de HCl ont été ajoutés et complété le volume avec de l'eau distillée avec ajustement du pH si nécessaire

### **II.5.3 Dosage du PA par spectroscopie UV-Visible**

#### **Détermination de la longueur d'onde maximale**

Pour déterminer la longueur d'onde maximale d'absorption du PA, nous avons préparé une solution étalon du PA. Ensuite nous avons dosé cette solution à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible en faisant un balayage de longueur d'onde entre 200 nm et 400 nm, nous avons obtenu une courbe représentant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde dont le pic maximal correspond à la longueur d'onde maximale du PA ( $\lambda_{\text{max}}$ ) qui est égale à 278 nm.

### **II.6 Test de dissolution**

La température du dissolu test réglée à 37 °C et l'agitation à 100 tours/min. le bac de capacité de 900 mL est rempli du milieu gastrique ou intestinal, une fois la température atteint 37 °C, on introduit la formulation préparée à l'intérieur du milieu en déclenchant immédiatement le chronomètre. Après un temps donné, on prélève 5 mL de la solution, puis on dose par spectrophotométrie UV visible à une longueur d'onde de 278 nm.

## **II.7 Caractérisation des microbilles**

Pour la suite de notre étude, le choix des concentrations de la matrice PA/Alginate de sodium a été fait à partir du test de dissolution.

### **II.7.1 Mesure du taux de gonflement**

Le système à gonflement est particulièrement intéressant pour la libération du principe actif parce qu'il laisse diffuser des molécules de masse molaire élevée, il a l'avantage de donner un type de libération indépendant des propriétés du principe actif.

Les propriétés de gonflement des microbilles dépendent de nombreux facteurs : le milieu de gonflement, les paramètres physico-chimiques...etc.

Les tests de gonflement sont effectués dans des conditions gastro-intestinal (GI), en immergeant une masse de 0,1g des microbilles (préalablement séchées à l'étuve sous vide à 65 °C pendant 48 heures) dans une solution tampon pH 2,20 ± 0,01 (HCl/KCl) pendant 2h, ensuite, dans une solution tampon pH 6,80 ± 0,01 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) pendant 22h. Après immersion, le poids des microbilles a été mesuré et le taux de gonflement a été calculé selon l'équation suivante :

$$G\% = (m_g - m_i) \times \frac{100}{m_i}$$

Avec :  $m_g$ : Masse des microbilles à l'état de gonflement en grammes.

$m_i$  : Masse des microbilles séchées en grammes.

### **II.7.2 Mesure de la densité**

La densité des billes d'alginate a été réalisée à l'aide d'un pycnomètre selon la loi suivante :

$$d = \frac{M_1 - \rho_e}{M_0 - M_2}$$

Avec  $M_0$  : Pycnomètre vide.

$M_1$  : Pycnomètre rempli de solide.

$M_2$  : Pycnomètre contenant le solide et rempli d'eau jusqu'au trait de jauge.

### **II.7.3 Taux d'humidité**

Un échantillon de microbilles d'alginate humide a été pesé et mis dans l'étuve sous vide à 65°C pendant 48 heures. Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H\% = (m_0 - m_f) \times \frac{100}{m_0}$$

Avec :  $m_0$  (g) : Masse initiale des billes humides en grammes à t=0

$m_f$  (g) : Masse finale des billes séchées en grammes à t= 48h

### **II.7.4 Analyse par infrarouge**

L'analyse par IR des échantillons des microbilles ainsi que l'extrait phénolique et l'alginate a été réalisé au moyen d'un appareil IR de marque BRUKER TENSOR II.

Les échantillons ont été broyé et sécher a 105°C. Ces derniers ont été mélanger avec KBr dans un rapport KBr/échantillon = 1,5.

### **II.8 Observation en microscopie optique**

Les microbilles ont été observé sur microscope optique de marque. Les microbille gélifié et séché ont été positionné sur une lame de verre puis observées sous microscope optique afin de vérifier la sphéricité, l'intégrité et la dispersion des microparticules de polyphénol dans le gel.

### **II.9 Etude de la stabilité des microbilles**

#### **II.9.1 Stabilité chimique**

Nous avons étudié la stabilité chimique des microbilles d'alginate en fonction du pH en utilisant le protocole expérimental suivant :

Des échantillons de 0,5 g de microbilles gélifiées humides (avec différentes concentrations de polyphénols) sont plongées séparément dans des solutions à différents pHs basique (12.26), acide (1.2) et neutre (7,75). L'ensemble est agité durant 48 heures à l'aide d'un agitateur magnétique. Les billes sont ensuite filtrées sur un Büchner et rincées plusieurs fois avec de l'eau distillées. Après lavage, les microbilles sont séchées dans l'étuve sous vide à 50 °C pendant 72 heures puis pesées.

### **II.9.2 Stabilité thermique**

Nous avons étudié la stabilité thermique des microbilles d'alginate en fonction de la température en utilisant le protocole expérimental suivant :

Des échantillons de 0.05 g de microbilles d'alginate séchées (avec différentes concentrations de polyphénols) ont été mis dans l'étuve sous vide à différentes températures ( $25 \pm 5$  °C) à l'air ambiant 37 °, 45 °C pendant 48 heures puis pesées et observées à l'œil nu.

### **II.9.3 Stabilité mécanique**

La rigidité mécanique des billes d'alginate a été étudiée par rhéologie en l'évaluant les deux modules de conservation ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) un gel par définition possède un plateau où  $G'$  est supérieur au  $G''$  en fonction de la fréquence sous  $\dot{\gamma} = 1\%$  ou bien en fonction de la vitesse du cisaillement à une fréquence de 1 Hz en mode oscillatoire.

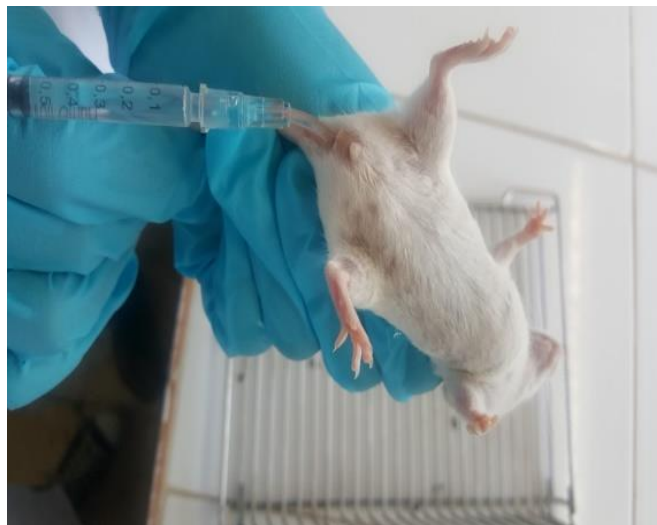
Toutes les analyses rhéologiques ont été effectuées avec un rhéomètre de marque MCR 302 Anton PaarPhysica (Anton Paar,GmbH,Germany). La géométrie utilisée est de type plan-plan avec  $\Phi = 8$  mm.

### III. ETUDE IN VIVO DE L'INFLAMMATION INTESTINALE

#### III.1 Méthode d'induction de la rectocolite ulcéro-hémorragique

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.

L'ulcération intestinale a été provoquée selon la méthode décrite par **Prabhu, V. et Guruvayoorappan, C. (2014)**. « **Protective effect of marine mangrove *Rhizophora apiculata* on acetic acid induced experimental colitis by regulating antioxidant enzymes, inflammatory mediators and nuclear factor-kappa B subunits.** » **International Immunopharmacology [96]** avec quelques modifications. Elle consiste en l'introduction intra-rectale d'un agent ulcérogène (voir figure II.4) : l'acide acétique  $\text{CH}_3\text{COOH}$  à 1 %. Un volume de 0,6 ml de celui-ci a été infusé lentement à l'aide d'un cathéter en plastique flexible d'une longueur de 4cm dans le côlon des souris à travers l'anus. Elles ont été ensuite maintenues en position basse pendant 30 secondes pour limiter l'expulsion de la solution. Les souris ont été pesées, marquées et réparties en six lots (n=3).



**Figure III.1 : Photo numérique montrant la méthode d'induction de la rectocolite ulcéro-hémorragique par voie rectale.**

Le tableau ci-dessous illustre la répartition des souris en différents lots selon la solution administrée

**Tableau III.1 : La nature des traitements reçus par les différents lots**

N° de lot	I	II	III	IV	V	VI
nature du traitement administré	Eau physiologique	Eau physiologique	sulfasalazine	Polyphénols 23mg	Polyphénols 16.5mg	Polyphénols 10mg
Induction de la colite (une heure après)	-	+	+	+	+	+

+ : colite induite /- : colite non induite

Le lot I recevant de l'eau physiologique est considéré comme lot témoin qui servira d'un modèle montrant le côlon dans son état physiologique. Le lot II recevant de l'eau physiologique et 0.6 ml d'acide acétique à 1% qui servira d'un modèle montrant le colon malade. Les quatre lots (III, IV, V, VI) traités respectivement avec le médicament la salazopyrine® (sulfasalazine 100 mg/Kg) considéré comme molécule de référence et le polyphénol à différentes concentrations (23 mg, 16.5 mg, 10 mg).

### **III.2 Mode d'administration du médicament**

1 heure après à l'induction de l'ulcère, le médicament salazopyrine® a été effectuée par un gavage intra-gastrique grâce à une sonde gastroœsophagienne, et les microbilles du polyphénol on était introduite une par une à l'aide d'une spatule (figure III.3). Cette procédure a été répétée quotidiennement pendant 3 jours, 5 jours et 7 jours pour voir l'évolution du traitement de la colite.

**Tableau III.2 : Les quantités journalières des différentes concentrations du polyphénol.**

Dose (mg/7J)	Quantité journalière de polyphénols et du médicament (mg)
10	1.42
16.5	2.35
23	3.28
Médicament de référence (salazopyrine®)	3.75

### **III.3 Etude de l'évolution pondérale**

Les souris ont été pesées chaque jour pendant la période de l'expérimentation.



**Figure III.2 : Photo numérique montrant la pesée des souris.**

### **III.4 Analyse clinique**

Les souris ont été mises sous une observation quotidienne pour distinguer leurs comportements et les symptômes de la rectocolite ulcéro-hémorragique. (Diarrhée, chute de poils, etc....)

### **III.5 Sacrifice et prélèvement des organes**

Le sacrifice des animaux a été effectué par l'éther. Le côlon a été prélevé puis conservé dans du formol à 4% à fin d'effectuer l'analyse histopathologique.



**Figure III.3 : Photos numériques montrant la préparation du matériel biologique pour l'expérimentation.**



### **III.6 Analyse histopathologique**

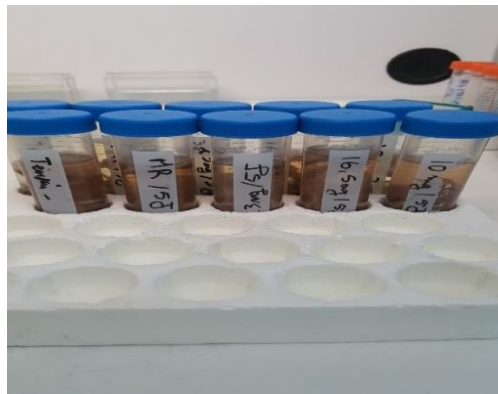
La technique de base comporte plusieurs étapes :

- Fixation des organes prélevés.
- Examen macroscopique et mise en cassette.
- Déshydratation et éclaircissement.
- Inclusion en paraffine.
- Confection des coupes.
- Etalement des lames.
- Coloration et montage des lames.

Une étape d'analyse macroscopique est indispensable, avant et/ ou après la fixation de la pièce.

#### **III.6.1 La fixation des organes prélevés**

Elle a pour but de conserver les structures tissulaires en évitant aussi leur autolyse. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du prélèvement dans un grand volume de formol à 4%. (Le volume du formol doit être 10 fois le volume de l'organe)

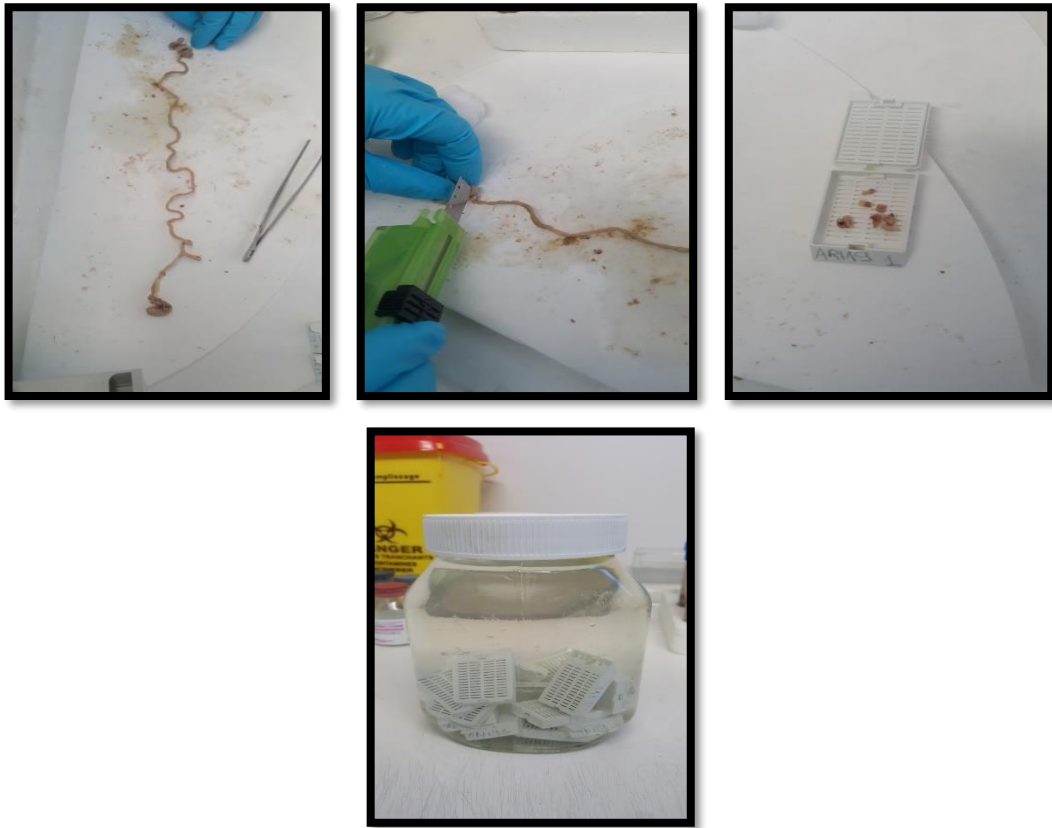


**Figure III.4 : La Conservation des organes dans le formol à 4%.**

#### **III.6.2 Examen macroscopique et mise en cassettes**

Les prélèvements sont examinés par la présence éventuelle de lésions macroscopiques. Ensuite, des sections tissulaires de 5mm sont effectuées et placées dans des cassettes identifiées à l'aide d'un crayon à mine.

Les cassettes sont placées dans du formol à 4%. La fixation permet le durcissement et la conservation de la morphologie des tissus.



**Figure III.5 : Coupe et mise en cassettes des tissus.**

### **III.6.3 Déshydratation et éclaircissement**

La déshydratation peut se faire manuellement ou à l'aide d'un automate ; elle permet l'élimination de l'eau contenus dans le tissu, on passe les tissus dans trois bains de xylène, son rôle c'est l'élimination de l'alcool, il facilite aussi leurs pénétrations par la paraffine. Cette étape dure environ 6 heures. Au fur et à mesure de l'infiltration par solvant, les tissus ont tendance à s'éclaircir.

Le tableau ci-dessous présente le programme de circulation au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques vétérinaires.

**Tableau III.3 : Le Programme de circulation au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques vétérinaires.**

Opération	Bain	Durée du séjour (min)
<b>Déshydratation</b>	N°1: alcool 90°	60
	N°2: alcool 96°	30
	N°3: alcool 100°	30
<b>Eclaircissement</b>	N°4 : xylène I	120
	N°5 : xylène II	120
	N°6 : xylène III	60
<b>Enrobage</b>	N° 7 : paraffine + xylène	120
	N°8 : paraffine pure	60

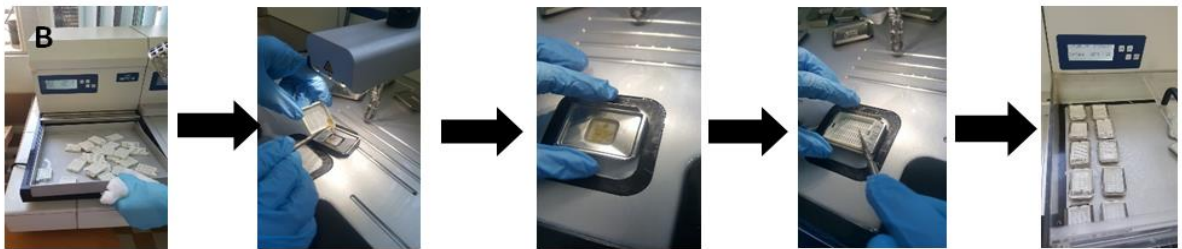


**Figure III.6 : Photos numériques montrant la déshydratation à l'aide d'un automate.**

#### **III.6.4 Inclusion**

Le tissu est placé dans la paraffine en fusion portée à 56/58°C, la chaleur provoque l'évaporation du solvant, les espaces ainsi libérés sont comblés par la paraffine.

Puis la paraffine chaude est placée dans des petits moules contenant les fragments. Les blocs ainsi formés seront mis au froid pour les rendre solides en utilisant une plaque réfrigérante à -20°C. On procède alors au démoulage ; on obtient ainsi des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine solide.



**Figure III.7 : A : Station d'enrobage ; B : Les Etapes d'inclusion.**

### **III.6.5 La microtomie**

A l'aide de microtome les blocs de paraffine vont être coupés de façon à réaliser des coupes d'environ  $3\mu\text{m}$ . L'ensemble des tranches de section vont former un ruban dans lequel on retrouve des coupes sériées de prélèvement tissulaire. Ils seront ensuite étalés sur des lames au bain marie à  $37^{\circ}\text{C}$  afin d'éviter les repliements du tissu. Les lames seront incubées dans l'étuve à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant au moins 1 heure à afin de se débarrasser de la paraffine et d'assurer l'adhérence des coupes.



**Figure III.8 : Photos numérique montrant les étapes de la microtomie.**

### III.6.6 Coloration des lames

Cette étape se déroule en 2 phases :

#### 1. Préparation des lames avant coloration :

- Déparaffinage : les lames passent par deux bains de xylène (20 minutes pour chacun)
- Réhydratation : successions de deux bains d'alcool (5 minutes pour chacun).
- Rinçage à l'eau de robinet.

#### 2. Coloration de base hématoxyline -éosine (HE) :

- Coloration à hématoxyline de Harris pendant 30 secondes.
- Rinçage à l'eau de robinet.
- Coloration à l'éosine pendant une minute.
- Rinçage à l'eau de robinet.
- Trempage rapide dans l'alcool 90°.
- Séchage et montage : dépôt d'une goutte de milieu de montage (Eukitt®) puis recouvrir à l'aide d'une lamelle.

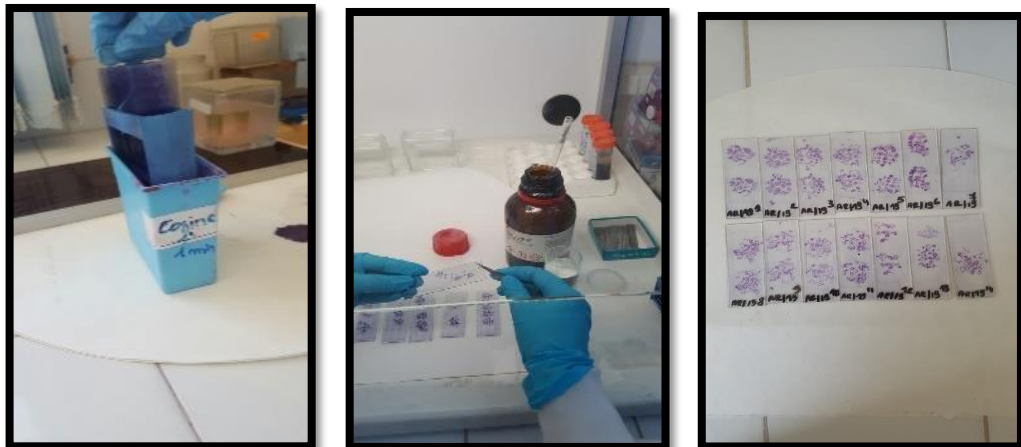


Figure III.9 : Photos numérique montrant la coloration et montage des lames.

## INTRODUCTION

Ce chapitre regroupe les résultats des différents tests obtenus et leur interprétation. Nous avons procédé par l'extraction et la caractérisation des produits purs, les différentes formulations qui ont été préparées, par les différentes techniques d'analyses telles que l'IRTF et le microscope optique. Ensuite on s'est intéressé à l'étude de la cinétique de libération in vitro (dissolu test) du PA, en se basant sur l'analyse UV-Visible pour déterminer la quantité du PA libéré.

Enfin, des tests in vivo ont été réalisés sur des souris (albinos) pour démontrer l'efficacité des polyphénols contre l'inflammation intestinale suivie par une anatomopathologie.

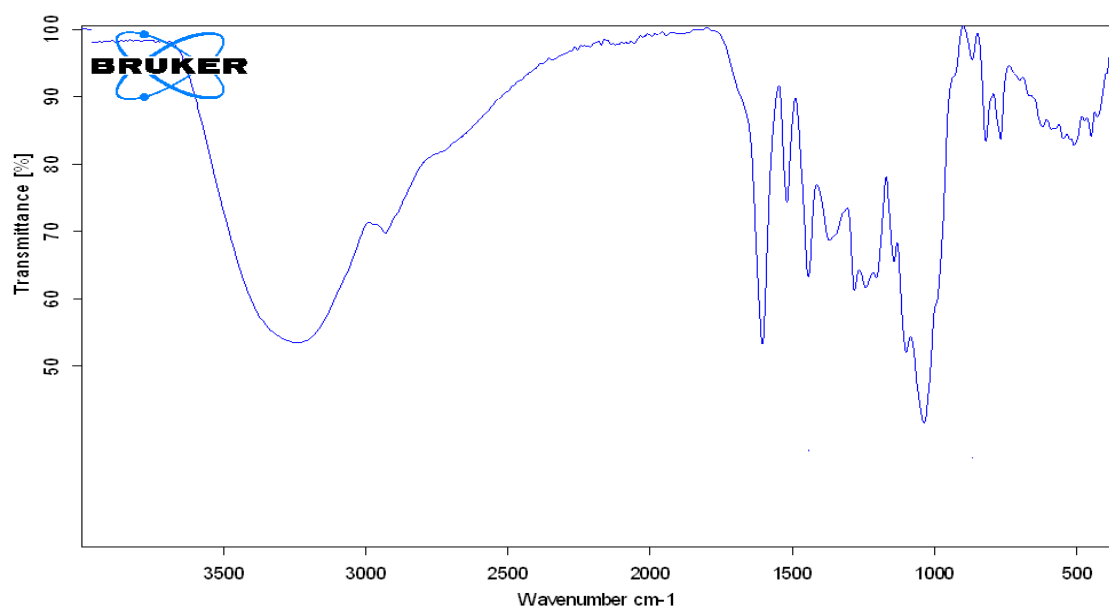
## I. CARACTERISTIQUES DES COMPOSES PHENOLIQUES

### I.1 Analyse par spectrophotométrie IR-TF

L'analyse par spectrophotométrie FT-IR est une méthode qui nous permet de déterminer les groupements fonctionnels donnés aux bandes les plus importantes.

Les spectres FT-IR ont été obtenu par d'un spectrophotomètre à transformer de fourier BRUKER TENSOR II à l'aide du logiciel OPUS. Le domaine d'étude du nombre d'onde  $\sigma$  est compris entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Pour effectuer une analyse, tous les produits sont directement déposés (sans préparation préalable)

Le spectre FT-IR d'extrait phénolique est présenté dans la figure I.1 ci-après :



**Figure I.1 : Spectre IR-TF d'extrait phénolique du marc de raisin**

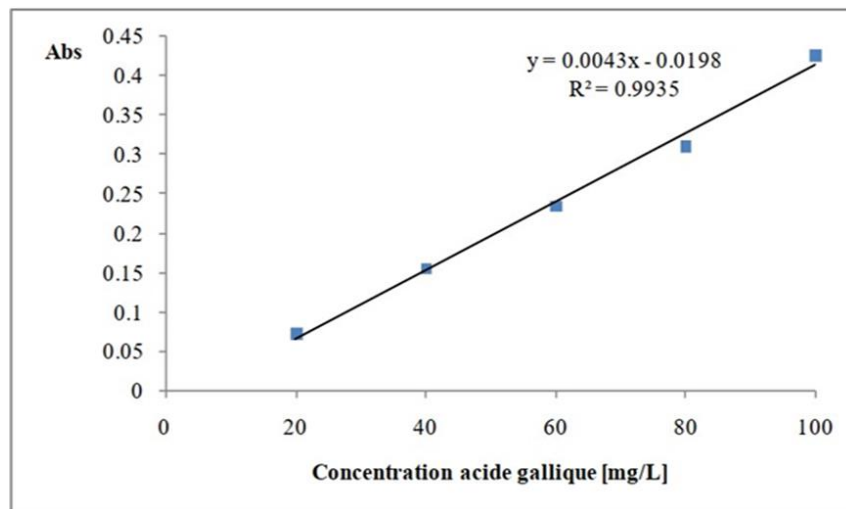
La bande large (3000-3500  $\text{cm}^{-1}$ ) montre la présence du groupe O-H de polyphénols avec une forte intensité.

- La bande d'absorption autour de 1604  $\text{cm}^{-1}$  indique la présence de liaisons C=C aromatiques.
- Le pic centré à 1280  $\text{cm}^{-1}$  est dû aux vibrations d'élongation associées aux liaisons C-O avec une forte intensité.
- Les pics entrent (1000-500  $\text{cm}^{-1}$ ) mettent en évidence la présence de liaisons C-H avec intensité moyenne.

## I.2 La teneur des polyphénols

Le taux des polyphénols totaux dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire, établie avec des concentrations précises d'acide gallique

(20-100 mg/L), (Figure I.2) comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.



**Figure I.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

L'extrait phénolique du marc de raisin a donné une teneur importante en polyphénols la 112.59 mg EAG/g de MS.

En se référant à la littérature, les travaux, montrent que le marc de raisin contient une teneur très élevée en polyphénols en comparant par d'autre type de fruits, cette teneur élevée peut être expliquée par les oligomères de proanthocyanidin liée par des liaisons covalentes avec les polysaccharides de la paroi cellulaire. Cette teneur varie d'une variété à l'autre : Cabernet Sauvignon = 164,9 mg EAG/g de MS Syrah= 160,0 mg EAG/g de

MS, Monastrell = 136,9 mg EAG/g de MS [97].

Les composés phénoliques du raisin se trouvent essentiellement dans les graines et les peaux avec environ 75% [98].

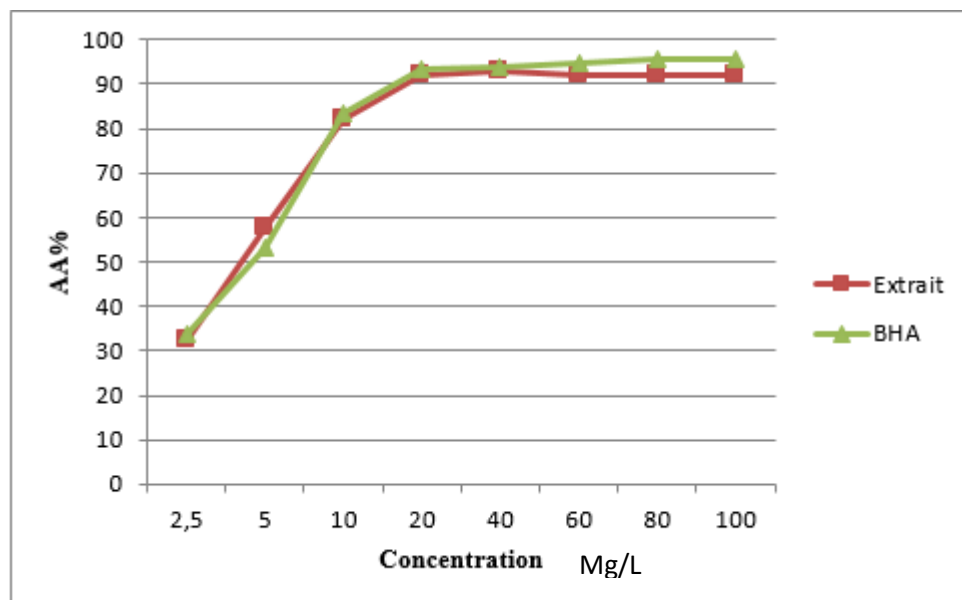
Cependant, il semble clair que la composition des marcs de raisin est fortement liée à la variété de raisin et le procès industriel appliqués, Le marc de raisin représente une bonne source des composés de valeur biologique pour plusieurs applications médicales, nutraceutiques et alimentaires [99, 100].

Les facteurs environnementaux tels que : la température, la géographie, la durée du jour et les éléments nutritifs, influencent fortement sur la biosynthèse et l'accumulation des métabolites secondaires de la plante [101].

### I.3 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des deux extraits vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Cette activité comparée avec celle d'un antioxydant de référence le BHA.

La figure I.3 représente les résultats obtenus pour ce dosage.



**Figure I.3 : Activité antioxydante de l'extrait et de BHA.**

De plus l'activité antiradicalaire (capacité d'éliminer le DPPH) est évaluée par la



détermination de la concentration correspondante à 50% d'inhibition (CI50). La valeur de CI50% la plus faible correspond à l'activité antiradicalaire la plus importante. Le tableau et la suivant représente les valeurs de CI50% enregistrés dans notre extrait en comparant de celle de BHA.

**Tableau I.1: Activité 50% d'inhibition**

Echantillon	CI50 [mg/L]
Extrait phénolique	4,32±0,21
BHA	4,97±0

## II. FORMULATION DES MICROBILLES

La formulation a été fait à une température ambiante a fin de facilité l'écoulement du fluide dans la sortie de la seringue, plusieurs paramètres sont pris en considération au long du processus des microbilles gélifiés par extrusion comme la hauteur seringue-solution  $\text{CaCl}_2$  et la vitesse d'agitation.

### II.1 Dosage du bain $\text{CaCl}_2$

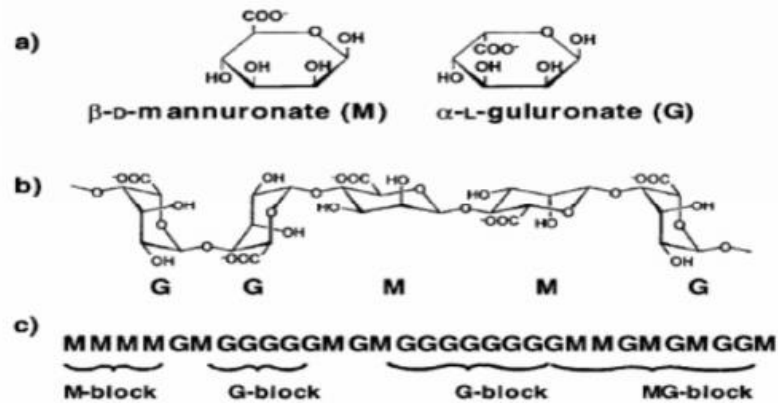
En utilisant la méthode du dosage des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu nous avons remarqué qu'il y avait aucun changement de couleur donc aucune trace des polyphénols dans le bain ce qui signifie que tous ces derniers ont été encapsulés.



**Figure II.1 : Solution du bain  $\text{CaCl}_2$  après le dosage**

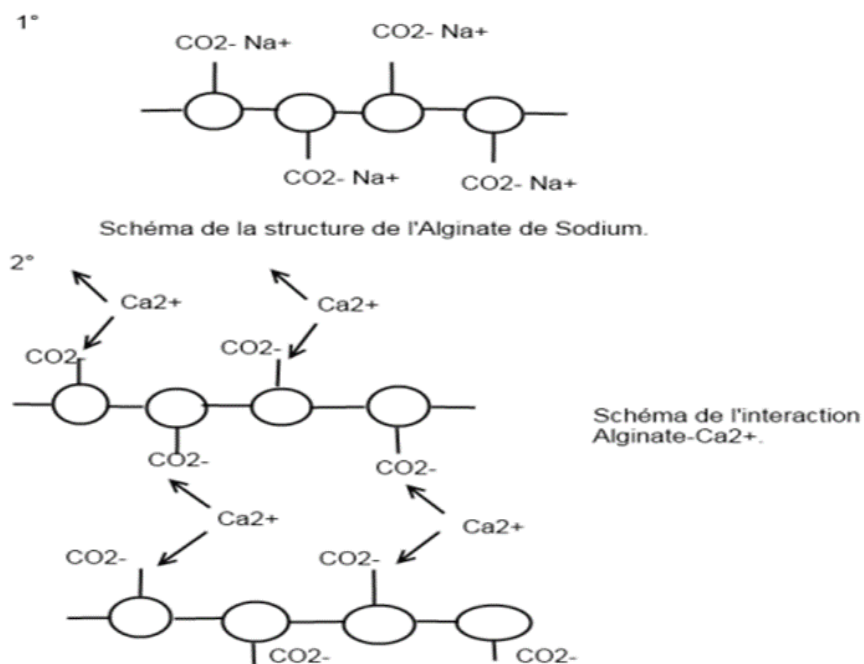
## II.2 Mécanisme de la formulation (la sphérification)

L'alginate de sodium est formé de groupements carboxyles  $\text{COO}^-$  et de  $\text{Na}^+$  ce qui lui rend électriquement neutre.



**Figure II.2:** a) monomères mannuronate M et guluronate G, b) poly-guluronate GG et polymannuronate MM, c) exemple d'enchaînement des blocs GG, blocs MM ou blocs alternés MG dans une chaîne d'alginate.

D'après [102], après ajout des cations multivalents à un sel d'alginate de sodium, les chaînes passent de l'état d'hélices flexibles à l'état ordonné en formant une liaison entre les guluronates (GG) de deux chaînes d'alginate, ces blocs G d'alginate de sodium retiennent par coordination les ions de calcium  $\text{Ca}^{2+}$  qui remplacent les ions de sodium  $\text{Na}^+$  en fonction de polarité.

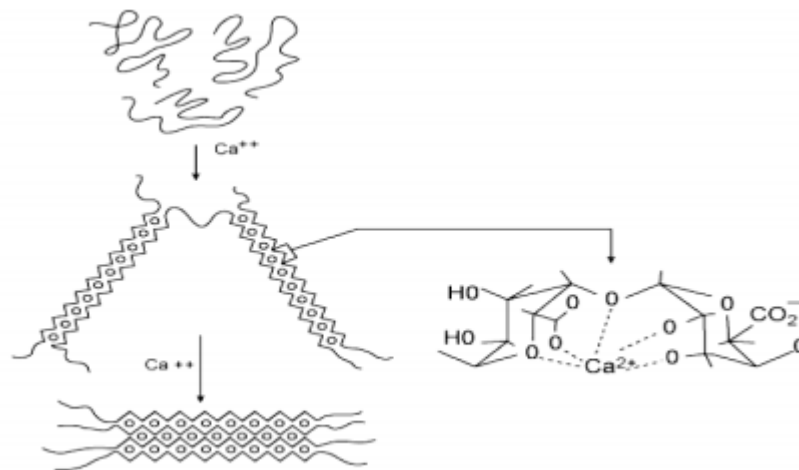


**Figure II.3 :** Mécanisme de gélification

En conséquence, la rigidité du gel est en fonction de la proportion et de la longueur du bloc G.

L'agrégation des chaînes parallèles conduit à un assemblage géométrique tridimensionnel régulier appelé "boîte à œufs" ionoréversible et non thermoréversible.

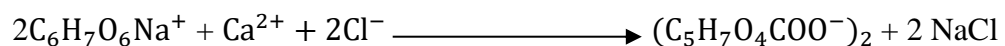
Cela permet la formation d'un gel, l'épaississement du liquide contenant l'alginate de sodium et ainsi qu'une pellicule durcie et forme la surface des billes. [102]



**Figure II.4 : Géométrie tridimensionnel "boîte à œufs"**

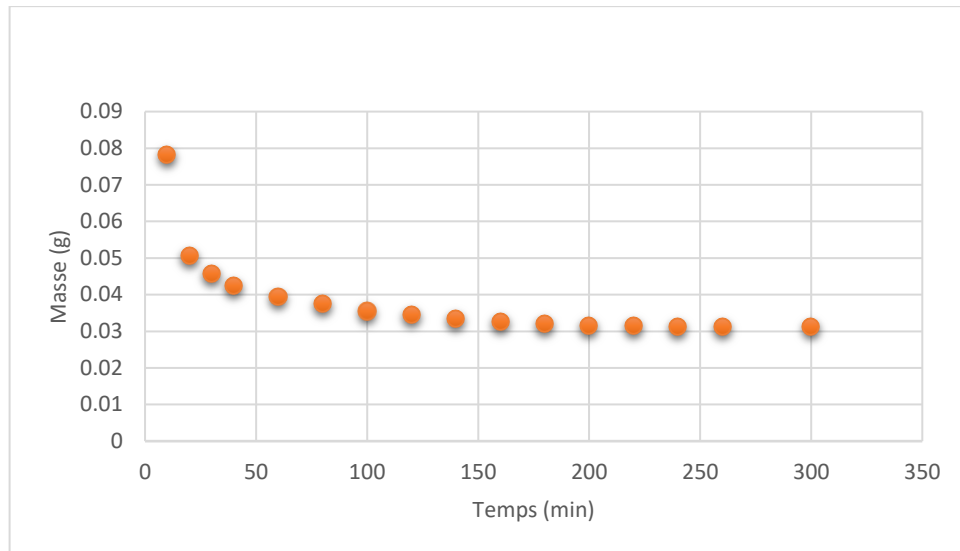
### ➤ Réaction chimique

D'après la littérature l'équation suivante représente la réaction chimique de ce mécanisme :



### **II.3 Test de maturation des microbilles**

Après avoir suivi l'évolution de la masse des microbilles gélifier en fonction du temps dans un bain CaCl<sub>2</sub> représenté graphiquement dans la figure ci-après :



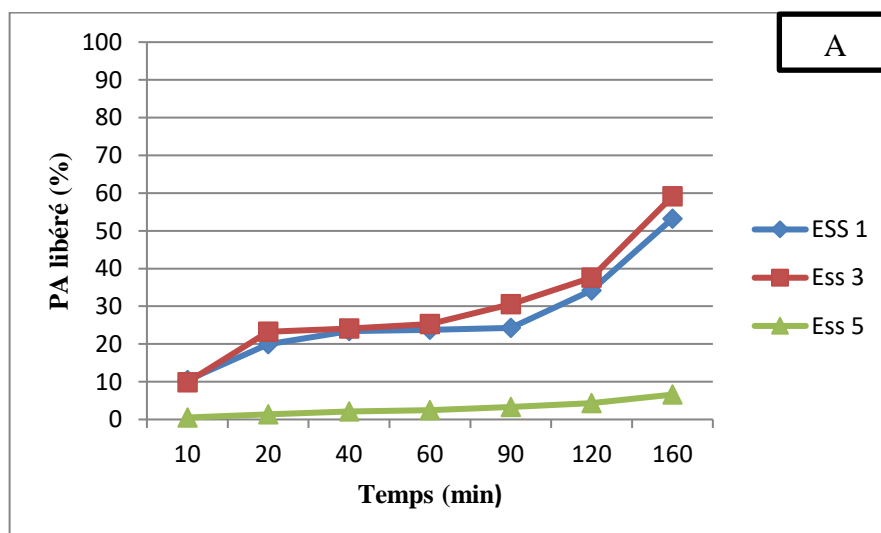
**Figure II.5 : Cinétique de gélification des microbilles contenant du polyphénol**

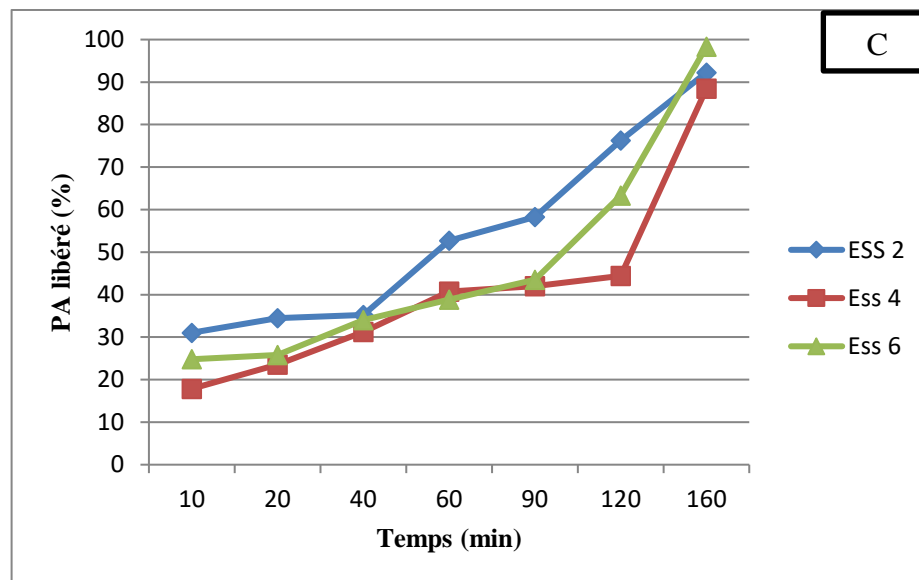
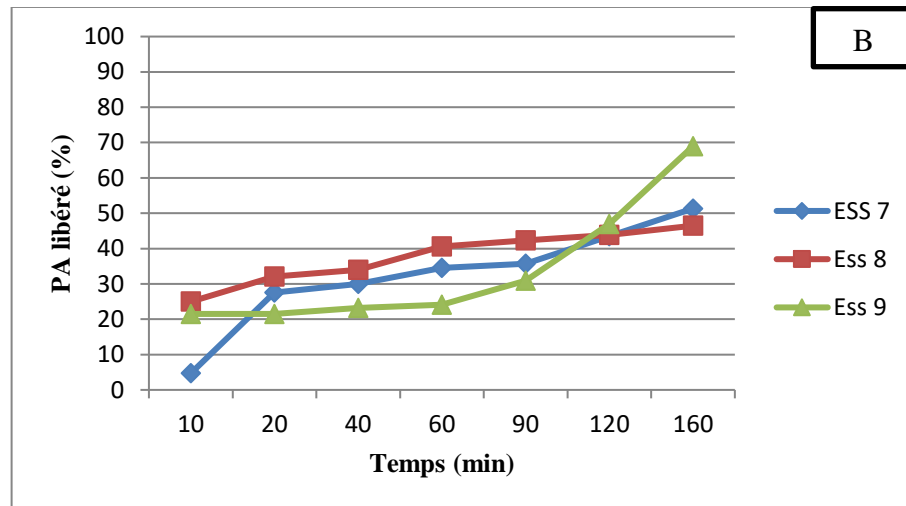
Les résultats obtenus dans la figure précédente montrent que la masse des microbilles diminue en fonction du temps et après 60 min elle commence à se stabiliser à cause de l'évacuation d'une partie de l'eau contenue dans la goutte.

En fin nous avons choisis un temps de maturation de 5 h qui est largement suffisant pour atteindre la gélification complète.

### III. TEST DE DISSOLUTION

Les figures suivantes (Figure III.1 A,B,C) montrent l'évolution du pourcentage du PA libéré en fonction du temps à partir des mélanges PA/Alginate avec différentes proportions d'alginate de sodium dans le milieu intestinal.





**Figure III.1 : Cinétiques de libération du PA à partir de différentes concentrations d'alginate à pH=6,8 et T=37°C. A : microbilles encapsulées avec 1,5 % d'alginate, B :**

Essai 1 : 10 mg de polyphénol, essai 2 : 10 mg de polyphénol, essai 3 : 23 mg de polyphénol, essai 4 : 23 mg de polyphénol, essai 5 : 16,5 mg de polyphénol, essai 6 : 16,5 mg de polyphénol, essai 7 : 10 mg de polyphénol, essai 8 : 23 mg de polyphénol, essai 9 : 16,5 mg de polyphénol.

Les résultats obtenus ont montré que, pour la formulation avec 1,5% d'alginate de sodium, la vitesse de libération du PA atteint jusqu'à 50% à 60% pour l'essai 3 et l'essai 1 après 120 min, tandis que pour l'essai 5 la vitesse de libération du PA est encore lente, où 10% du PA ont été libéré après 160 min.

Pour la formulation avec 1,75% d'alginate, la vitesse de libération du PA est plus rapide par rapport à la formulation avec 1,5% d'alginate, où 50% à 70% du PA ont été libéré dans 160 min.

Pour la formulation avec 2% d'alginate le profil de libération du PA atteint son maximum après 160 min (98 %).

D'après les résultats obtenus, la vitesse de libération du PA est proportionnelle à la quantité du polymère incorporée. Plus la formulation est concentrée en masse du polymère, plus la vitesse de libération du PA augmente.

Ce résultat est intéressant dans le sens que l'amélioration de la solubilité, permet de réduire les effets secondaires car la dissolution rapide du PA évite le contact direct des cristaux de PA avec la muqueuse gastrique et donc diminue son irritation [103].

#### IV. CARACTERISATIONS DES MICROBILLES

A partir du test de dissolution, le choix de la concentration d'alginate de sodium a été fixé à 2%.

##### IV.1 Densité, taux d'humidité, taux de gonflement

Le tableau suivant représente les résultats de la densité, du taux d'humidité et du taux de gonflement des microbilles synthétisé ainsi que pour l'alginate.

**Tableau IV.1 : Caractéristiques de différentes microbilles préparées.**

<b>Caractéristiques</b>	<b>rg (g)</b>	<b>Taux de gonflement %</b>	<b>rh (g)</b>	<b>Taux d'humidité %</b>	<b>Densité</b>
<b>Microbilles</b>					
<b>Polyphénols (mg)</b>					
<b>10</b>	10.122	3278.9	0.1182	95.86	0.9993
<b>16.5</b>	8.0478	2570.36	0.1169	95.16	0.9999
<b>23</b>	3.6719	1166.90	0.0957	95.60	1.0002
<b>Alginate</b>	1.3787	898.2	0.0958	96.08	0.9990

Ou les paramètres suivants représentent

rg : rapport massique pour le taux gonflement (g), rh : rapport massique pour le taux d'humidité (g).

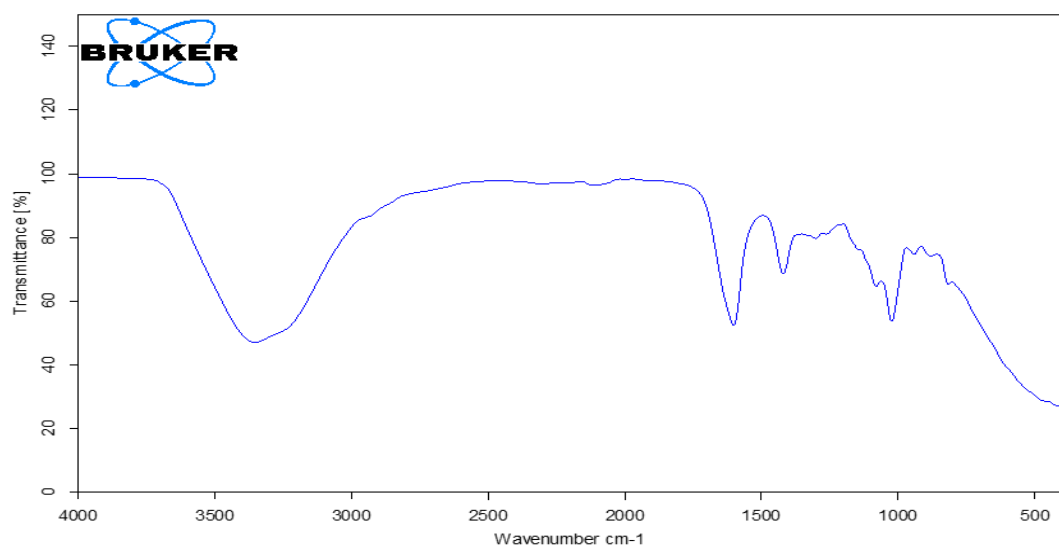
Les résultats obtenus dans le tableau précédent montrent que :

- Le taux d'humidité des microbilles gélifié augmente quand la dose de polyphénol diminue.
- Les densités des microbilles obtenues est supérieur à celle de l'eau ( $0.998 \text{ g.cm}^{-3}$ ) ce qui explique leurs émergences dans la solution aqueuse.
- Par contre les taux de gonflement ce diffère plus la quantité des polyphénols augmente plus le taux de gonflement diminue.

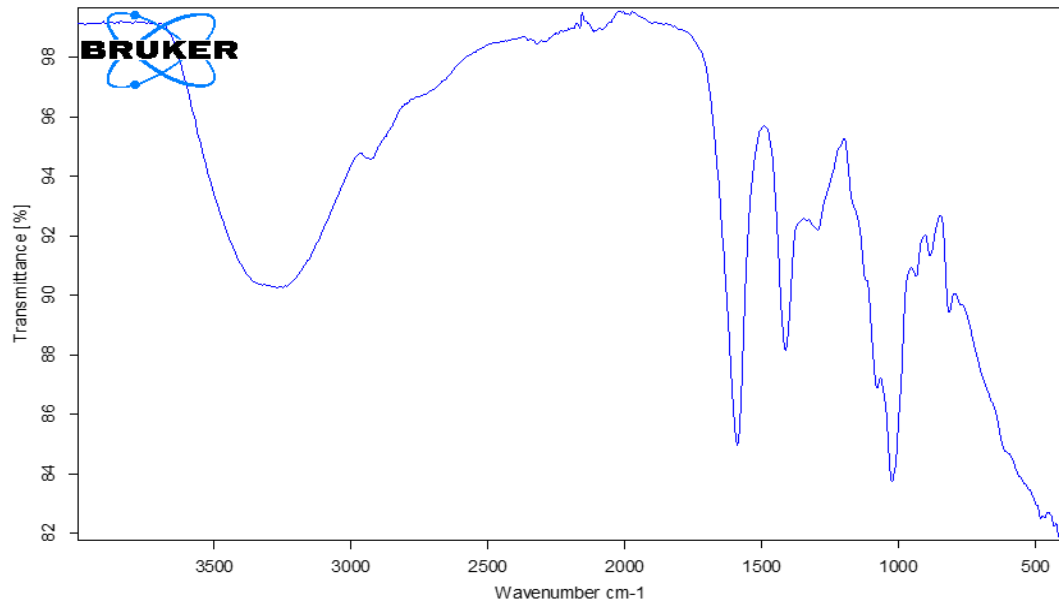
#### **IV.2 Analyse par spectrophotométrie IR-TF**

Les spectres IR-TF ont été obtenu par d'un spectrophotomètre à transformer de fourier BRUKER TENSOR II à l'aide du logiciel OPUS. Le domaine d'étude du nombre d'onde  $\sigma$  est compris entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Pour effectuer une analyse, tous les produits sont directement déposés (sans préparation préalable)

Les spectres IR-TF des microbilles d'alginate et de l'extrait phénolique encapsulé dans les microbilles sont présentés dans les figures suivantes.



**Figure IV.1: Spectre IR-TF des microbilles d'alginate**

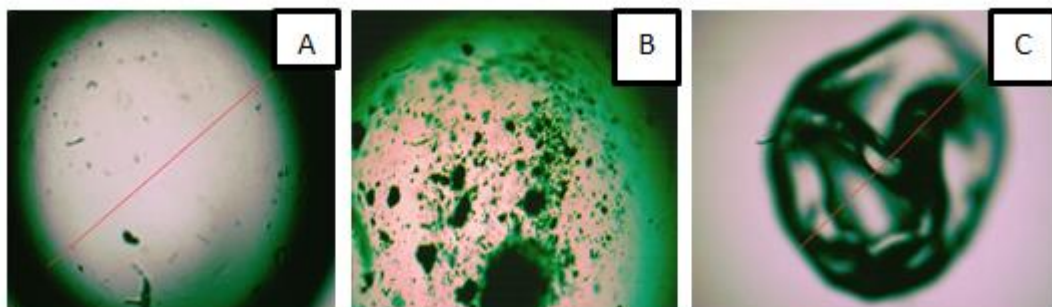


**Figure IV.2: Spectre IR-TF des microbilles d'extrait phénolique encapsulé dans l'alginate**

La comparaison du spectre FT-IR du PA pur avec les spectres de la microbille d'alginate et de microbilles PA/Alginate de sodium nous a permis de retrouver tous les pics caractéristiques du PA ce qui nous confirme sa présence dans les formulations de notre microbille ou en d'autres termes son encapsulation.

### **IV.3 Observation par microscope optique**

Les microbilles préparées pour cette étude ont été observées au microscope optique.



**Figure IV.3 : Photographies optique des microbilles gélifiées, A) bille d'alginate alginate humide, B) microbille du polyphénol humide, C) bille du polyphénol sec.**

L'examen de l'analyse par microscope optique des microbilles permet de tirer les conclusions suivantes :

- La sphéricité des microbilles



- La couleur des microbilles est brune caractéristiques de la présence des polyphénols et blanche pour celles d'alginate.
- Dispersion des microparticules des polyphénols dans tout le volume de la sphère des microbilles (figure IV.3 B)
- La taille des microbilles est de l'ordre de 412,270  $\mu\text{m}$  pour les microbilles humides et de 87,952  $\mu\text{m}$  pour les microbilles sèches.

Les diamètres des microbilles sont obtenus à partir du traitement de photographies numériques à l'aide d'un logiciel OPTIKA.

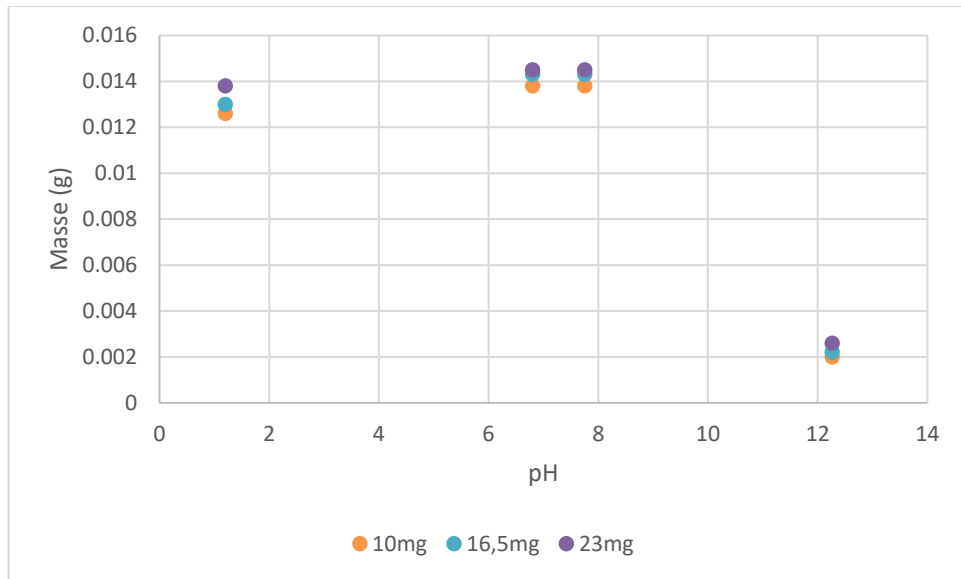
Les microbilles sont relativement homogènes en taille : le suivi du comportement des microbilles au cours du séchage montre que le processus de séchage est accompagné par une diminution de la taille et une restructuration importante des microbilles. La diminution du diamètre au cours du processus du séchage est de 95%. Le diamètre diminue significativement après 24 h de séchage et reste constant après 72h.

#### **IV.4 Test de stabilité**

Il est très important de déterminer la stabilité des microbilles des polyphénols encapsulé dans l'alginate de sodium dans des milieux à pH et a Températures différents.

##### **IV.4.1 Stabilité chimique**

Nous avons étudié le comportement des microbilles dans des solutions aqueuses de pH variables la figure IV.4. Ci-dessous représente les masses des différentes microbilles séchées en fonction du pH.



**Figure IV.4 : Effet du pH sur la stabilité chimique des différentes doses de microbilles.**

Nous pouvons dire que :

Les microbilles de 1.2 à 7.75 sont stables par contre en augmentant le pH à 12.26 ce qui est un milieu très basique les microbilles deviennent friable et non utilisable non seulement pour les analyses mais aussi comme médicament celui-ci s'explique par le fait qu'en milieu basique, il se produit un échange d'ionique entre les ions  $Ca^{2+}$  et les ions  $Na^+$  de la base NaOH. Les liaisons entre les chaînes qui sont assurées par le calcium sont rompu ce qui provoque la destruction en partie du réseau d'alginate.

#### **IV.4.2 Stabilité thermique**

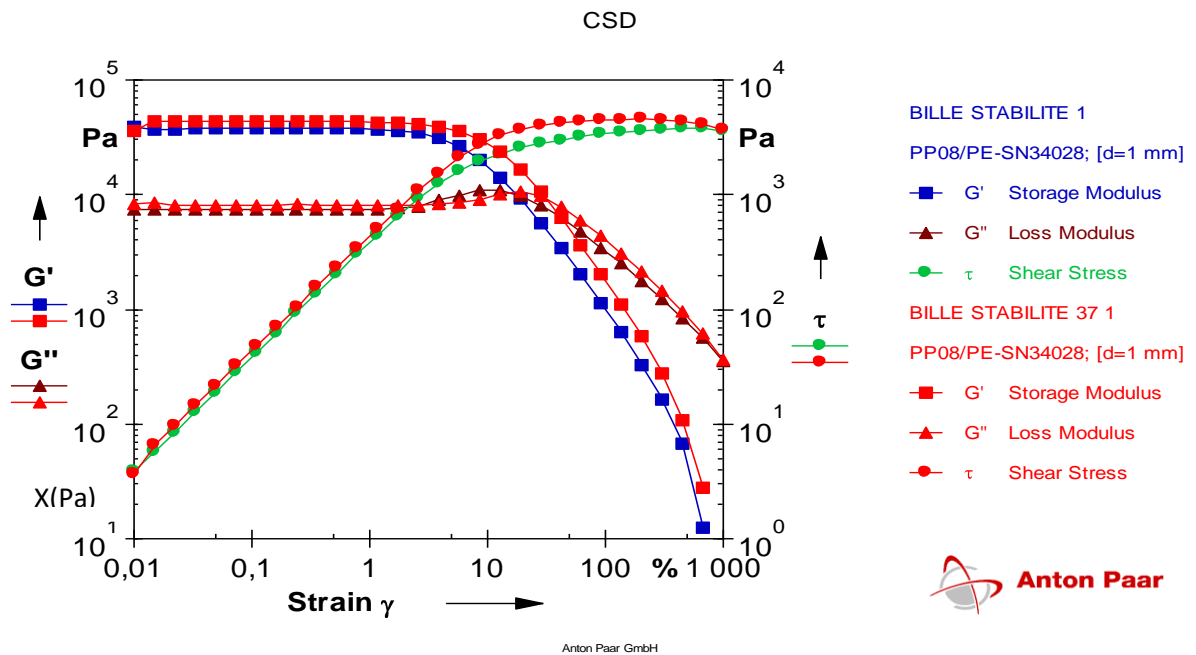
Nous avons étudié le comportement des microbilles avec différentes température et nous avons conclu qu'ils sont stables au niveau de ces températures.

Aucun changement de poids, morphologie, tailles des microbilles n'a été remarquer.

#### **IV.4.3 Stabilité mécanique**

L'examen de la figure IV.5 présente la variation de  $G'$  et  $G''$  en fonction du cisaillement. Ces résultats montrent l'examen que la bille exhibe un comportement solide viscoélastique avec  $G'$  de l'ordre de 50 KPa et supérieur au  $G''$ .

Ce comportement est maintenu dans une zone linéaire (LVE) sur une gamme de cisaillement allant de 0.01 à 100 s<sup>-1</sup>. Au-delà de cette région, nous avons le point gel ou les deux modules se retrouve au point d'intersection ( $G'=G''$ ). C'est le point de rupture des billes au-delà duquel les comportements s'inversent et le système se comporte comme un liquide viscoélastique ( $G'' > G'$ ).



**Figure IV.5 : Variation de  $G'$  et  $G''$  en fonction du cisaillement**

La figure IV.6 nous montre la variation de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la fréquence à différentes températures. Nous remarquons que les billes se comportent comme un solide viscoélastique aux faibles fréquences (0.01 à 10 Hz), ce qui correspond aux temps les plus élevés. La valeur du point gel n'est pas accessible dans ce test car elle correspond aux fréquences excessivement élevées. Les tests effectués aux différentes températures ne montrent pas de variation du module de conservation et donc du comportement rhéologique de la bille. A ce stade nous pouvons dire, que les billes sont stables thermiquement.

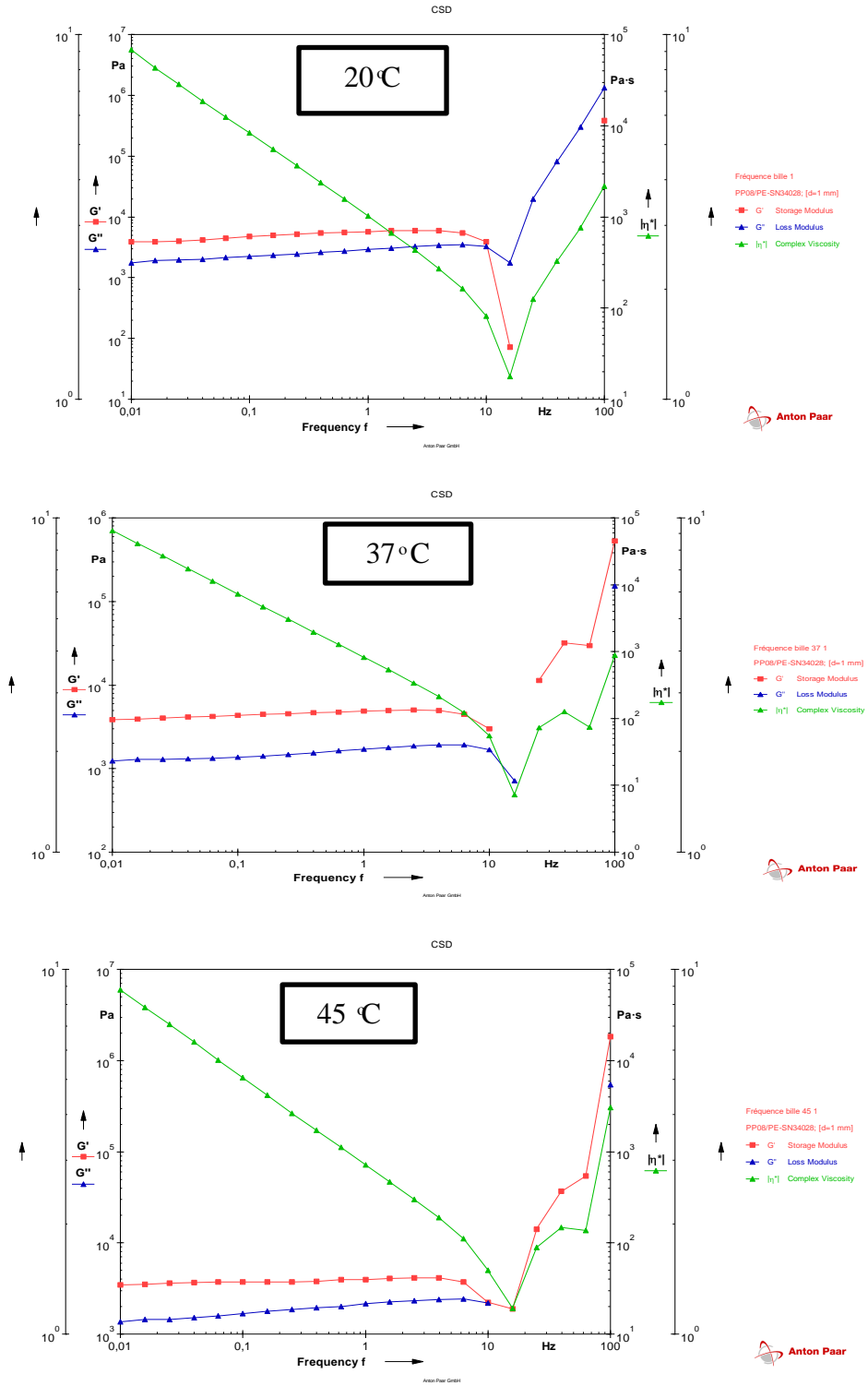


Figure IV.6 : Variation de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la fréquence et la température.

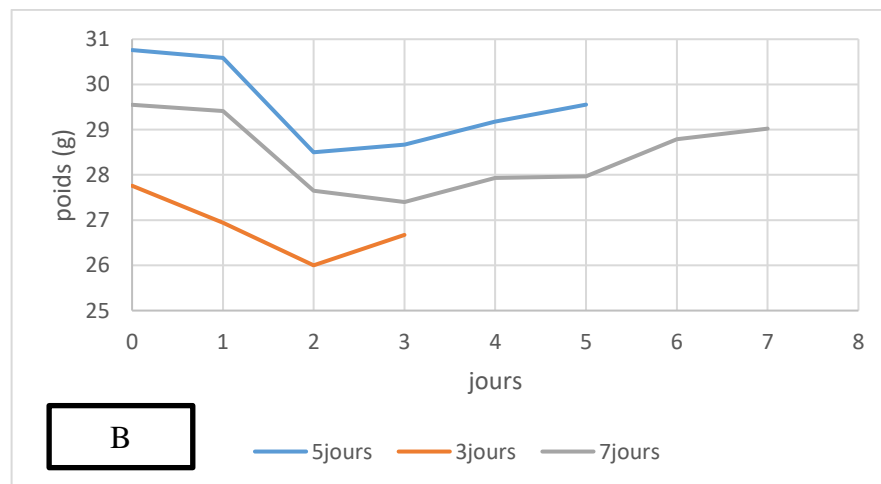
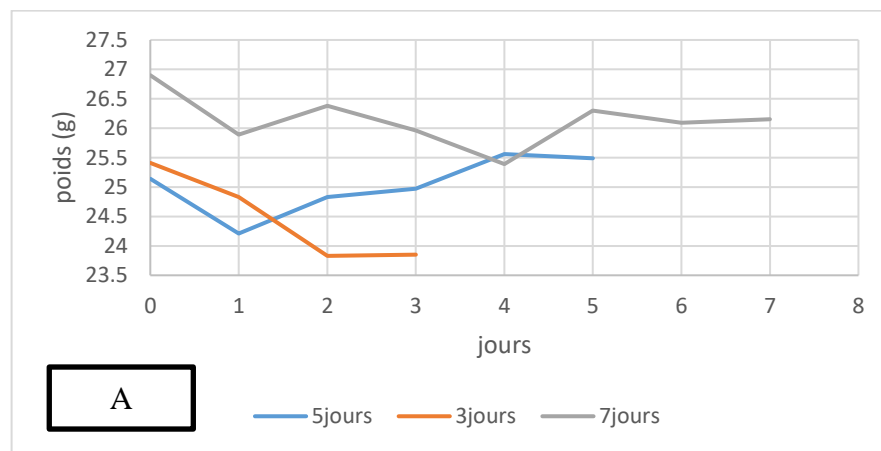
## V. ANALYSES CLINIQUES

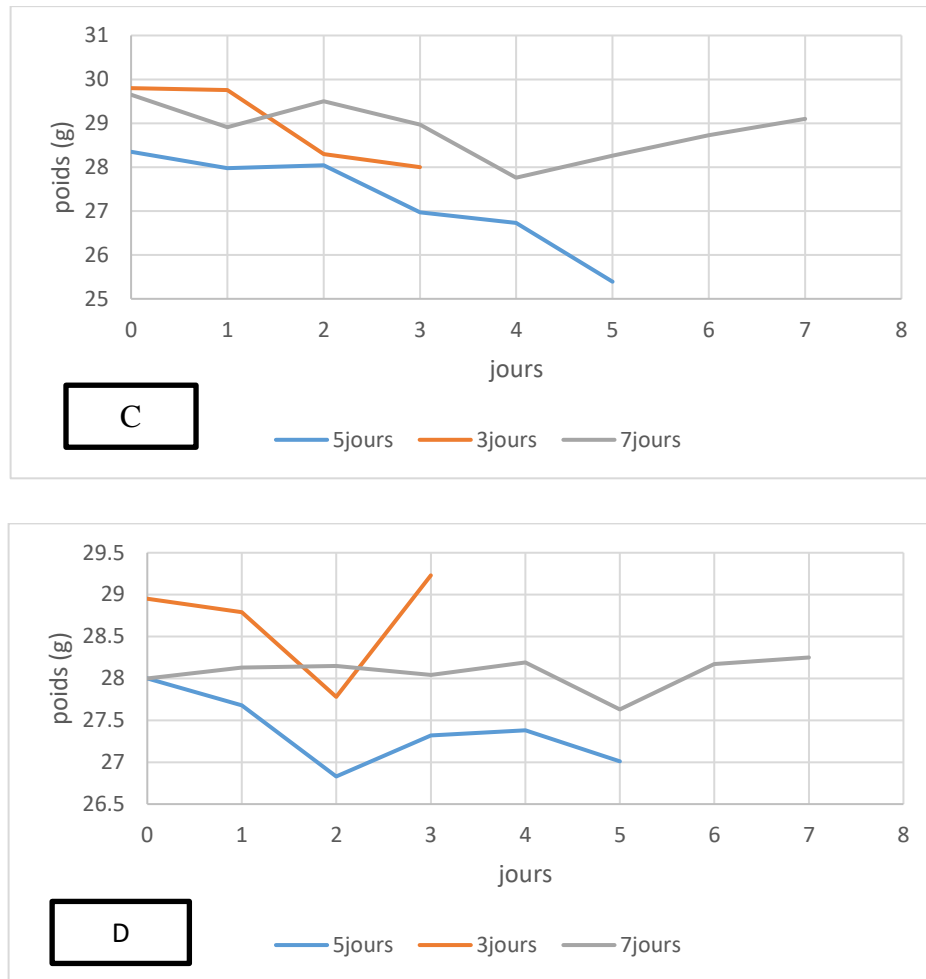
### V.1 Symptomatologie et comportement des animaux

Pendant cette période, les animaux ont été soumis à une observation quotidienne pour diagnostiquer les symptômes de la maladie de la colite ulcéreuse (comportement, symptômes) représenté dans l'annexe 07.

### V.2 L'évolution pondérale des souris

Les figures suivantes représentent l'évolution du poids des souris traitées par les différentes formulations ainsi que celles qui sont traités par le médicament de références.





**Figure V.1 : Evolution du poids des souris traitées par les différentes formulations en comparant avec le médicament de référence pendant 7 jours. A : Souris traitées avec 10 mg de polyphénols, B : Souris traitées avec 16,5 mg de polyphénols, C : Souris traitées avec 23 mg de polyphénols, D : Souris traitées avec Salazopyrine.**

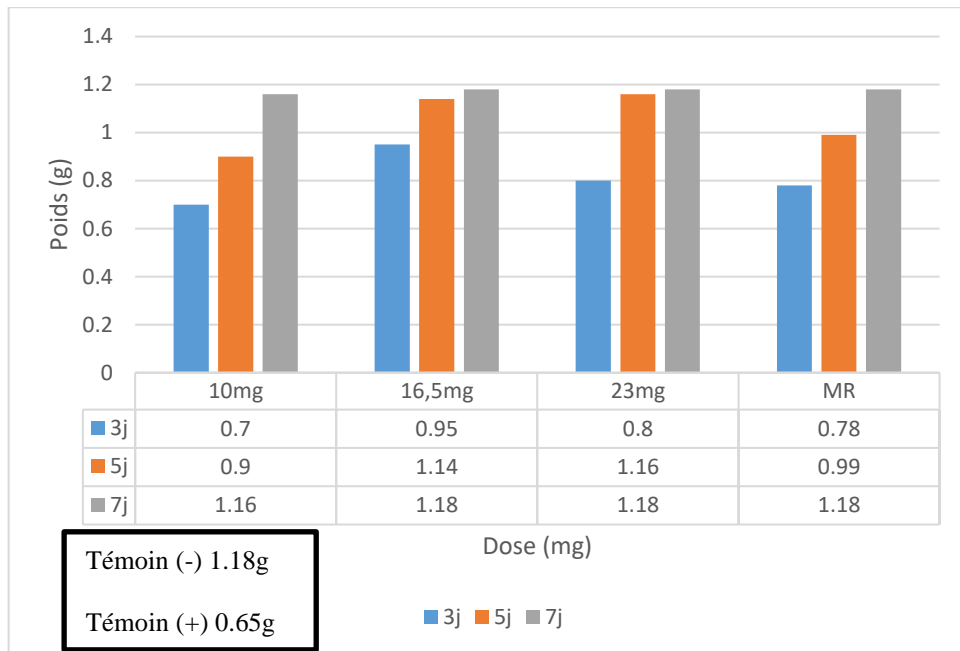
Les résultats obtenus dans les figures précédentes montrent que le poids des souris a diminué juste après l'administration de l'acide acétique à cause d'une forte diarrhée. Les souris traitées par les microbilles de 16.5 mg d'extrait phénolique et le médicament de référence ont commencé à reprendre leurs poids au bout du 3<sup>ème</sup> jours par contre les autres microbilles correspondent aux concentrations 10 mg et 23 mg c'est au bout de 5<sup>ème</sup> jours.

Cette diminution de poids est due aux effets secondaires des polyphénols et aussi aux symptômes de l'inflammation intestinale qui provoquent une perte de l'appétit et une diarrhée donc automatiquement une perte de poids [37, 15-16].

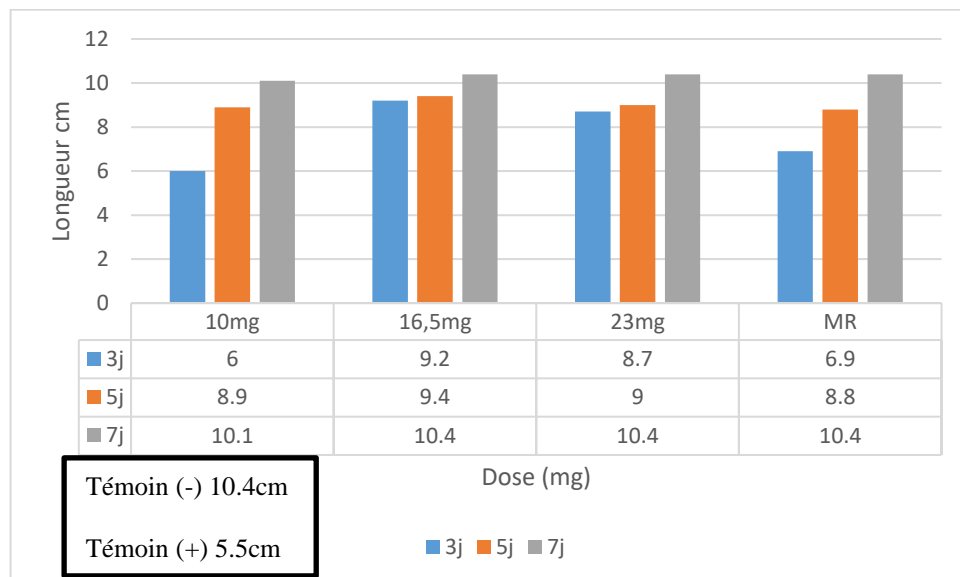
Les tableaux sur l'annexe 08 représentent l'évolution pondérale quotidienne des souris

### V.3 L'évolution pondérale et la longueur du colon

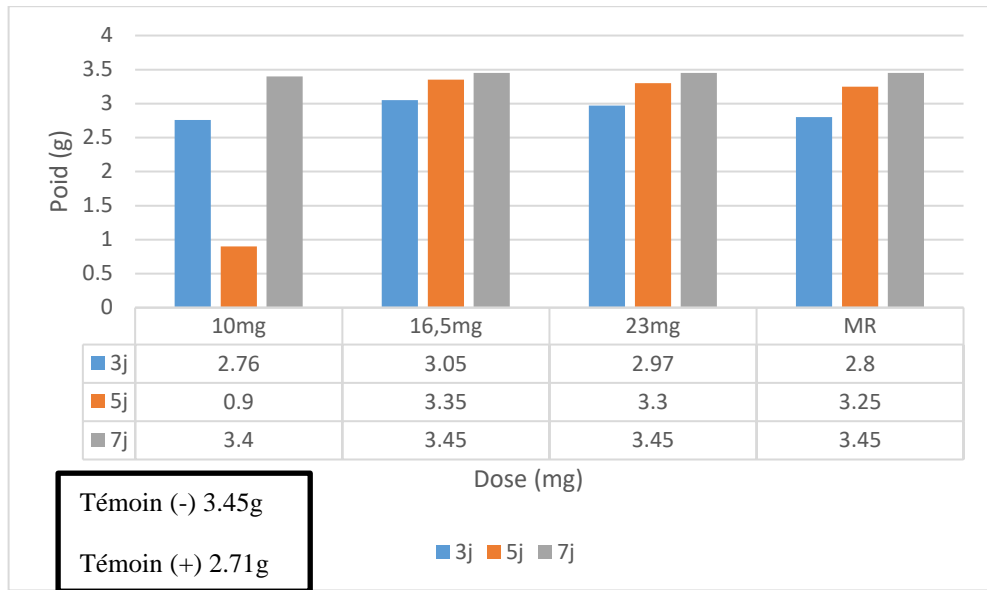
Les figures suivantes représentent les variations pondérales du colon et du système digestif ainsi que la longueur de chacun.



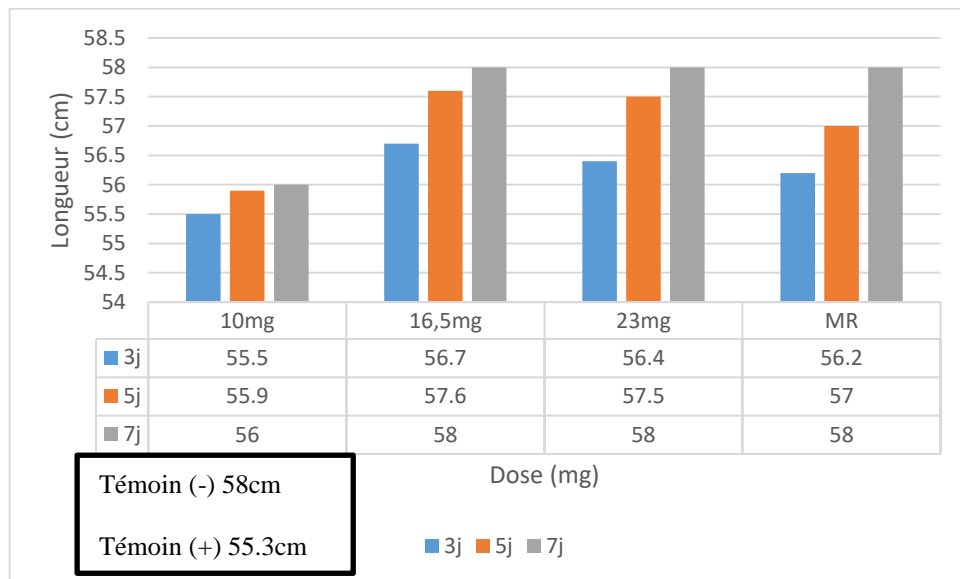
**Figure V.2 : Variations pondérales du colon**



**Figure V. 3 : Variations de la longueur du colon**



**Figure V. 4 : Variations Pondérale du système digestif**



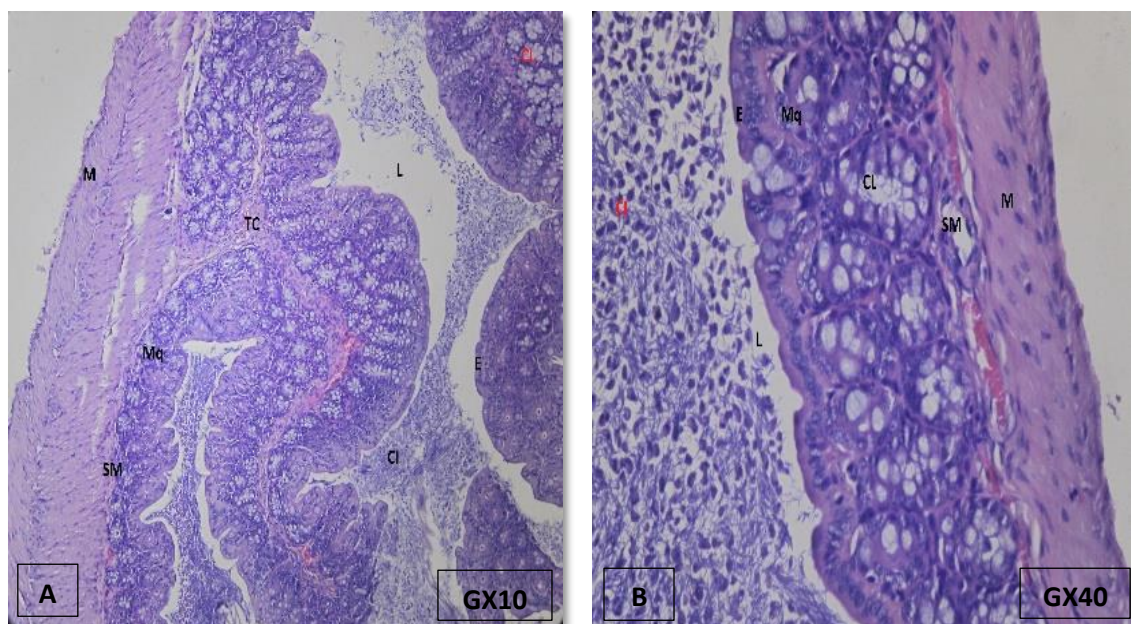
**Figure V. 5 : Variations de la longueur du système digestif**



## VI. Étude histologique

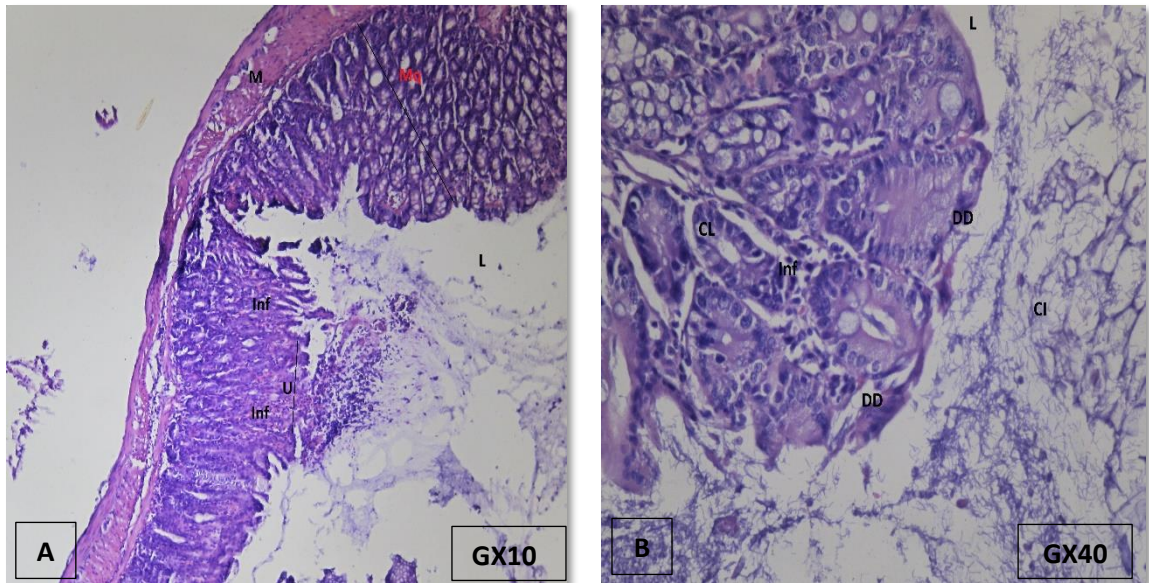
Le colon du témoin négatif montre une architecture normale de la muqueuse intestinale (figure VI.1), par contre pour le colon du témoin positif qui a reçu de l'acide acétique on remarque une inflammation dans la muqueuse et une ulcération focale de l'épithélium de surface ainsi qu'une dégénérescence et une desquamation des entérocytes de surface (figure VI.2).

Après avoir provoqué une inflammation nous avons eu une diminution du poids et de la longueur du colon du témoin positif par rapport au témoin négatif qui est probablement dû à une perte tissulaire caractérisée par l'ulcération, la dégénérescence et la desquamation épithéliales. Ces lésions épithéliales au niveau du colon provoquent un problème d'absorption au niveau des entérocytes et donc une diminution de l'absorption hydrique au niveau de la matière fécale qui sorte sous forme de diarrhée.



M : musculature, TC : tissu conjonctif, L : lumière, Mq : muqueuse, SM : sous muqueuse, E : entérocyte/ épithélium, CL : Crypte de Lieberkühn

**Figure VI.1 : Coupe histologique du colon de la souris témoin négatif. A : GX10, HE, muqueuse normale, B : GX40, HE, muqueuse normale.**



M : musculature, L : lumière, Mq : muqueuse, Inf : inflammation, U : ulcération.

**Figure VI.2 : coupe histologique du colon de la souris témoin positif. A : GX10, HE, inflammation et ulcération focale. B : GX40, HE, dégénérescence et desquamation épithéliales**

En comparaison aux témoins positifs et négatifs, la souris traitée avec le médicament de référence (sulfasalazine) qui a été sacrifiée le 3eme jour montre une dégénérescence et desquamation des entérocytes de surface. L'absence d'ulcération telle qu'observée chez le témoin positif signe probablement selon nous un début de guérison. Nous avons observé une diminution de l'inflammation à j5 et j7 toujours comparativement au témoin positif. La souris qui a été sacrifiée le 5eme jour nous remarquons une ulcération dégénérescence et desquamation au niveau de l'épithélium de surface. Et en fin pour la souris qui a été sacrifiée le 7eme jour nous remarquons une diminution de l'inflammation et un aspect qui est proche du témoin négatif.

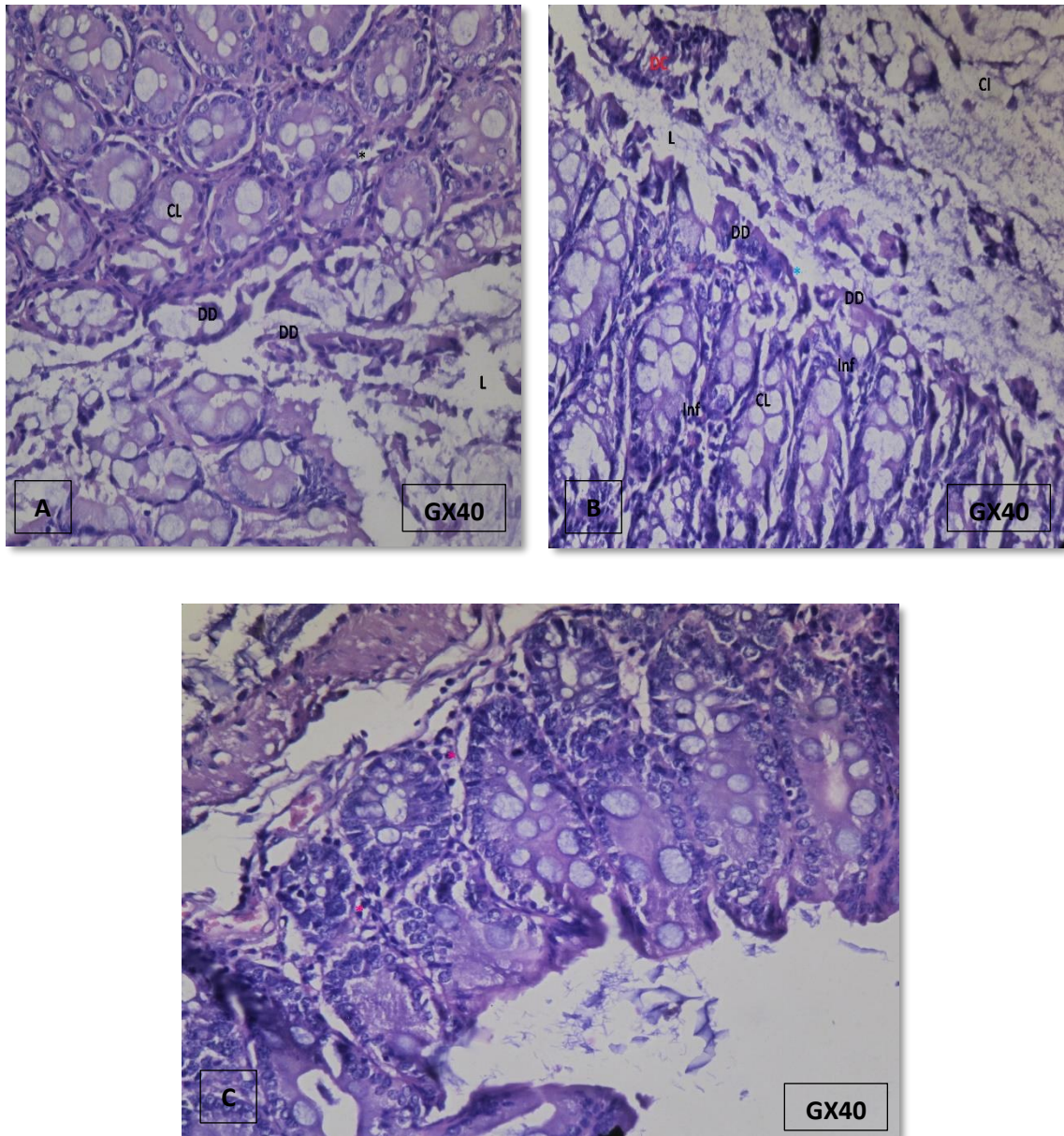
Ces observations sont interprétées par le pouvoir anti-inflammatoire de la sulfasalazine qui est soumis après administration orale à une dégradation via les bactéries du côlon donnant ainsi une manifestation de deux composés : le sulfapyridine et le 5-ASA (5-aminosalicylate). Ces derniers sont des inhibiteurs puissants et spécifiques de l'NF-kB, un médiateur central de la réponse inflammatoire [104].

La Sulfasalazine réduit également l'inflammation en activant les récepteurs nucléaires (PPAR $\gamma$ ) fortement exprimé au niveau de nombreuses cellules de l'immunité non

spécifique par l'inhibition de la synthèse des TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 au moyen de son pouvoir antiprolifératif sur les cellules épithéliales [105].

Les résultats obtenus suite à l'utilisation de la Sulfasalazine (100 mg/kg) concordent avec deux autres études : la première menée par l'équipe de recherche de Thippeswamy et al (2011) [106], qui ont induit une rectocolite ulcère-hémorragique par la même technique que nous avons suivie dans notre étude, où des scores macroscopiques de l'ordre de (0.83 $\pm$ 0.16) ont été signalés, par rapport au lot contrôle (4.80 $\pm$ 0.58).

La deuxième réalisée par Sakthivel & Guruvayoorappan (2013) [107], qui ont démontré par leur expérience menée sur des rats, que l'injection intra-péritonéale de la Sulfasalazine (100 mg/kg) a amélioré significativement le score macroscopique jusqu'à 4.

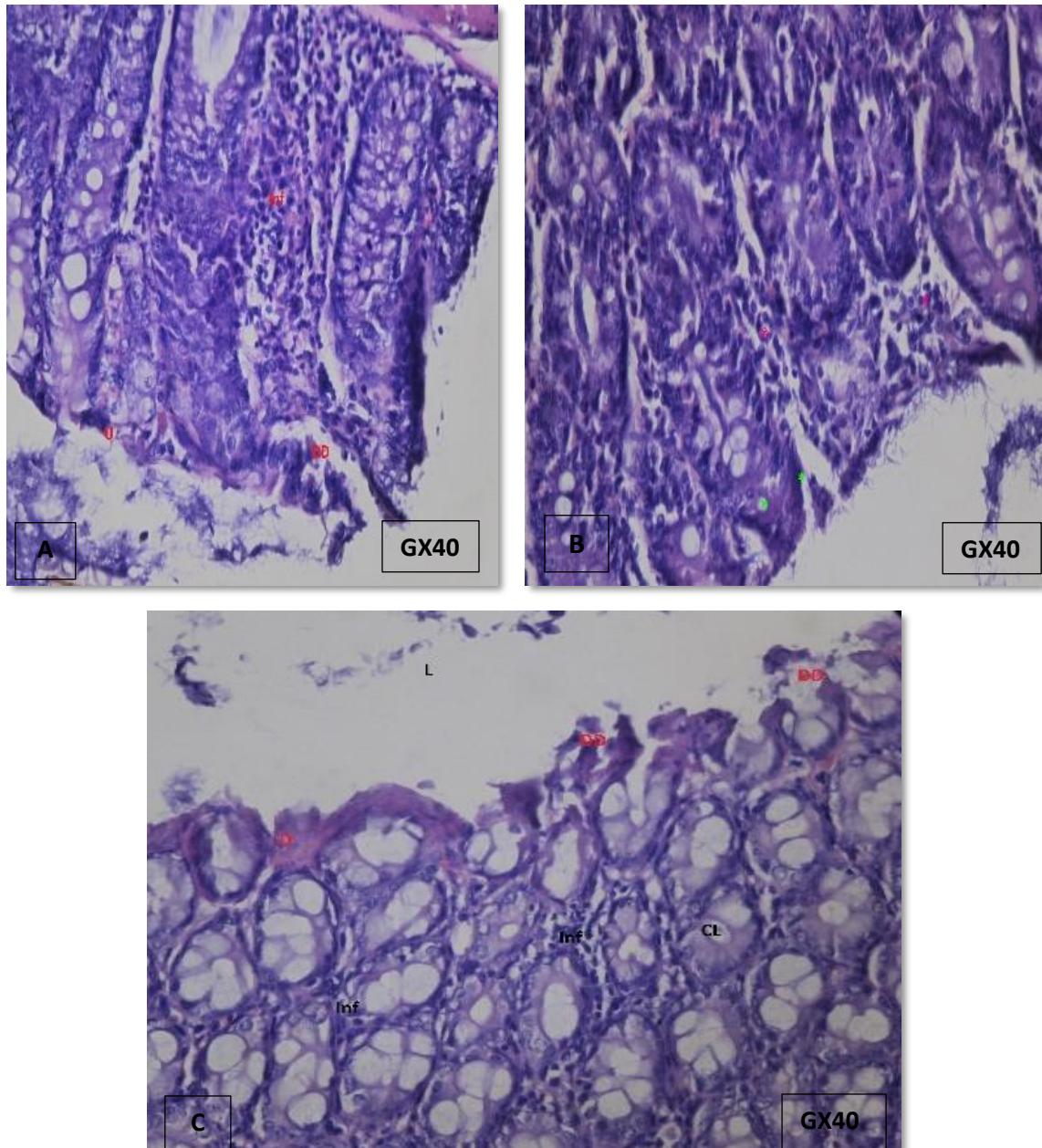


L : lumière, CL : Crypte de Lieberkühn, DD : dégénérescence et desquamation, Inf : inflammation.

**Figure VI.3 : Coupe histologique des colons des souris traitées avec le médicament de référence. A : GX40, HE, J3, Dégénérescence et desquamation des entérocytes de surface. B : GX40, HE, J5, ulcération dégénérescence et desquamation. C : GX40, HE, J7, Diminution de l'inflammation, un aspect proche du témoin négatif.**

Pour ce qui est du traitement au polyphénol, la souris traitée avec du polyphénol à 10 mg qui a été sacrifiée le 3ème jour montre une inflammation au niveau de la muqueuse ainsi qu'une dégénérescence et desquamation au niveau de l'épithélium de surface. Et pour la souris sacrifiée au 5ème jour nous remarquons une diminution des lésions dégénératives épithéliales et une diminution de l'inflammation par rapport au témoin positif. Et enfin

pour la souris qui a été sacrifiée le 7<sup>ème</sup> jour nous remarquons une dégénérescence et une desquamation épithéliales minimales ainsi qu'une légère inflammation dans la muqueuse (Figure VI.4).

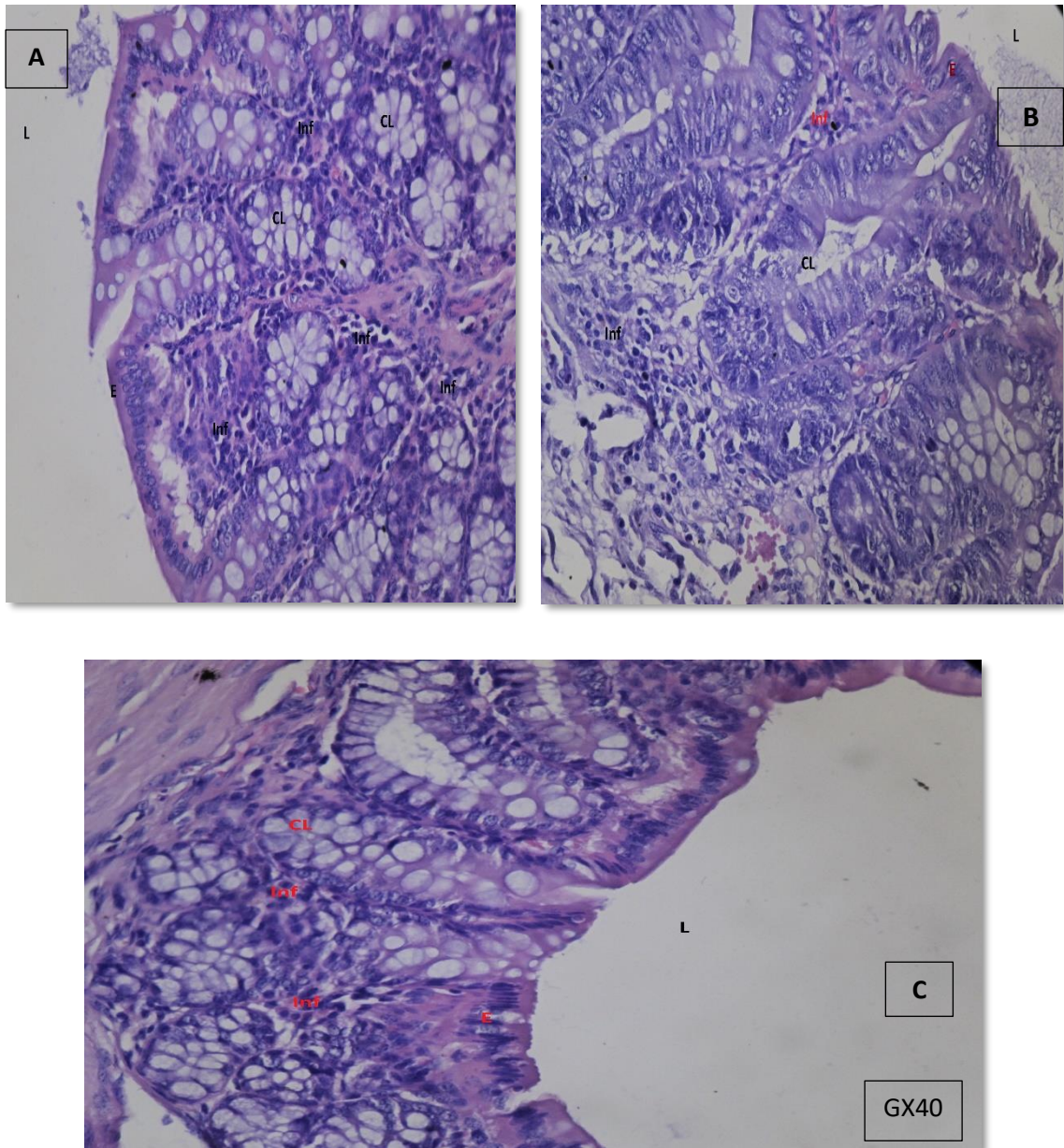


L : lumière, CL : Crypte de Lieberkühn, DD : dégénérescence et desquamation, Inf : inflammation.

**Figure VI.4 : Coupe histologique des colons des souris traitées avec 10mg du polyphénol. A : GX 40, HE, J3, inflammation dégénérescence et desquamation inflammation. B : GX40, HE, J5, Diminution des lésions dégénératives épithéliales et diminution de l'inflammation par rapport au témoin positif. C : GX 40, HE, J7, dégénérescence et desquamation épithéliale minimale et une légère inflammation dans la muqueuse.**

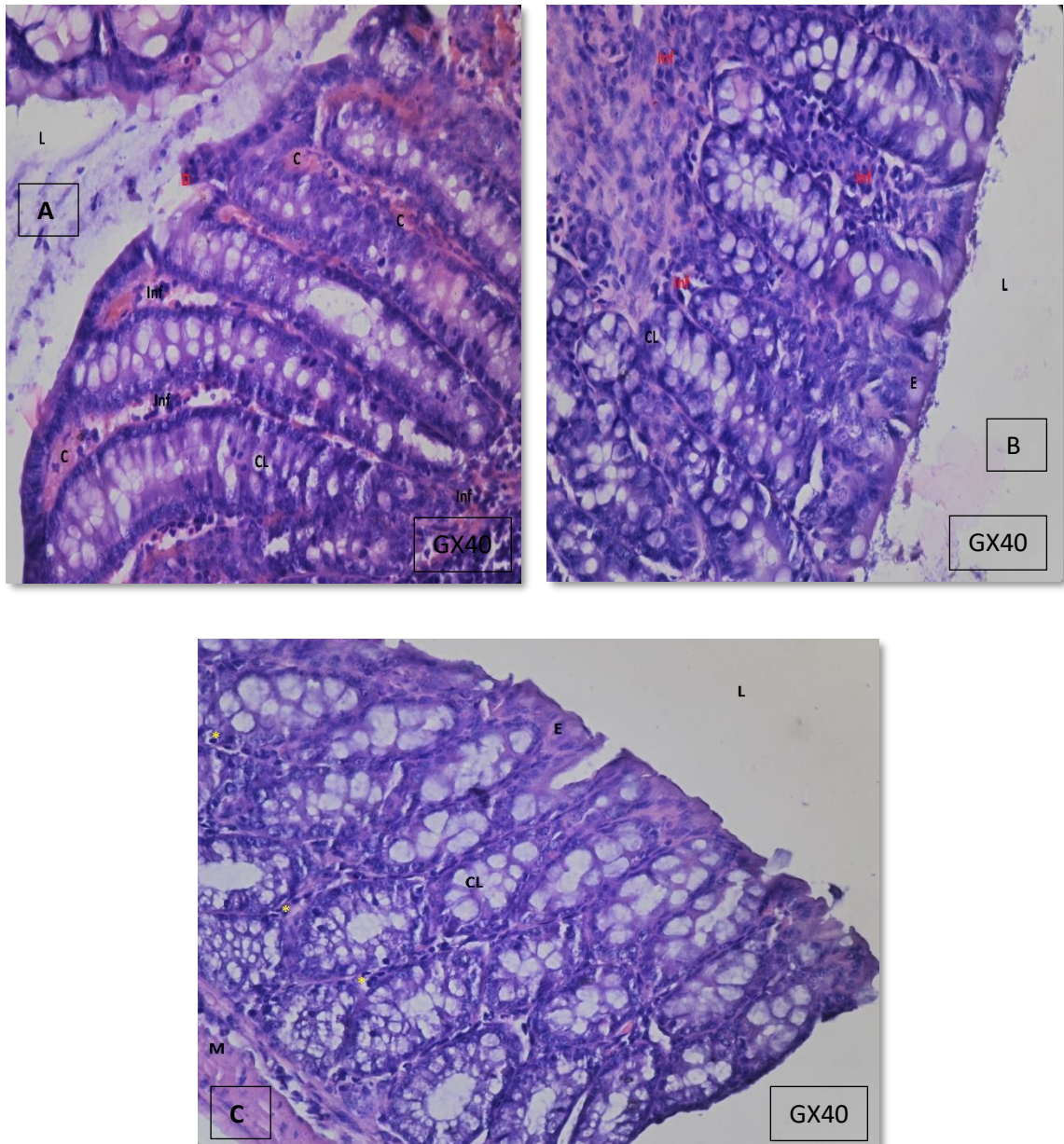
La souris traitée avec du polyphénol à 16.5 mg qui a été sacrifiée le 3ème jour montre une inflammation moins importante par rapport au témoin positif et une absence de lésions épithéliales. Et pour la souris qui a été sacrifiée au 5ème jour, on observe une absence de lésions épithéliales et un infiltrat inflammatoire moins important dans la muqueuse et la sous muqueuse. Pour la souris sacrifiée au 7ème jour, nous notons un aspect proche du témoin négatif caractérisé par une absence de lésions épithéliales et la présence de quelques rares cellules inflammatoires dans la muqueuse. (Figure VI.5)

La souris traitée avec du polyphénol à 23 mg qui a été sacrifiée le 3ème jour montre une inflammation et une congestion ainsi qu'une légère dégénérescence épithéliale. Et pour la souris qui a été sacrifiée le 5ème jour, nous remarquons une inflammation moins importante par rapport au témoin positif, l'absence de lésions épithéliales et la présence de quelques infiltrats inflammatoires dans la muqueuse et la sous muqueuse. Et enfin pour la souris qui a été sacrifiée le 7ème jour, on observe un aspect proche du témoin négatif, caractérisée par l'absence de lésions épithéliales et la présence de quelques rares cellules inflammatoires (figure VI.6).



L : lumière, CL : Crypte de Lieberkühn, DD : dégénérescence et desquamation, Inf : inflammation, E : entérocyte/ épithélium.

**Figure VI.5 : coupe histologique des colons des souris traitées avec 16.5mg du polyphénol. A : GX40, HE, J3, absence de lésions épithéliales et une inflammation moins importante par rapport au témoin positif. B : GX40, HE, J5, Absence de lésions épithéliales et des rares cellules inflammatoires dans la muqueuse infiltrat inflammatoire moins important dans la sous muqueuse. C : GX40, HE, J7, absence de lésions épithéliales quelques cellules inflammatoires dans la muqueuse un aspect proche du témoin.**



L : lumière, CL : Crypte de Lieberkühn, Inf : inflammation, M : musculuse, E : entérocyte/ épithélium, C : congestion.

**Figure VI.6 : coupe histologique des colons des souris traitées avec 23mg du polyphénol. A : GX40, HE, J3, une inflammation et congestion et une légère dégénérescence épithéliale. B : GX40, HE, J5, une inflammation moins importante par rapport au témoin positif absence de lésions épithéliales et des infiltrats inflammatoires dans muqueuse et sous muqueuse**



Nous avons remarqué une diminution de l'intensité et de la distribution des lésions par rapport au témoin positif au fur et à mesure de l'augmentation de la dose et de l'avancement dans la durée du traitement. Mis à part le 23 mg à J3 ou nous avons observé de la congestion et de l'inflammation. L'intensité importante des lésions observées à J3 pourraient être reliées à des facteurs propres au sujet concerné.

Pour les doses 10mg et 16.5mg nous avons un début de guérison caractérisée par la diminution de l'ulcération épithéliale et la diminution de la dégénérescence et de la desquamation.

A J5 et J7 l'inflammation diminue par rapport au témoin positif par contre pour la dose 10 mg a J7 nous avons constaté qu'il y a encore une faible dégénérescence et la présence de l'inflammation avec aspect proche du témoin négatif.

L'analyse histologique témoigne l'effet thérapeutique des polyphénols. Un effet similaire a été observé avec le resvératrol (1 mg/ kg/j) administré à titre préventif chez des rats ayant une colite conduite par le DSS [108]. Divers produits du raisin tels que des proanthocyanidines de pépins de raisin ou du jus de raisin ont également montré une protection contre les altérations histologiques consécutives à l'administration de TNBS [109]. De plus, Cheah et al. (2013) [110] ont montré que l'administration d'un extrait de pépins de raisin prévient l'augmentation du score histologique induite par le DSS seulement dans la partie proximale du colon tandis qu'aucun effet n'a été observé au niveau distal. Une consommation préventive d'anthocyanes de myrtille atténue également les atteintes histologiques induite par DSS [111]. De même dans une étude semblable l'extrait de marc de raisin montre une protection contre les altérations histologiques induite par DSS ils ont trouvé que la dose 23mg donne un effet meilleur que des doses plus élevées [37].

## CONCLUSION

Le marc de raisin constitue une source importante de polyphénols. Ces constituants sont connus par leurs propriétés thérapeutiques divers. Toutefois, du fait du goût astringent des composés phénoliques, ce dernier est inutilisable en l'état brut. Ce qui motive la recherche de solutions techniques à cet inconvénient que nous menons dans ce travail.

L'encapsulation des composés phénoliques par un biopolymère (alginate de sodium) s'avère une option envisageable, car elle a donné la possibilité de libérer les composants bioactifs de marc de raisin.

Ce travail nous a permis en premier lieu de maîtriser les plus simples techniques analytiques en passant de l'extraction des polyphénols aux outils analytiques de base dans l'étude des composantes les plus intéressantes contenues dans une biomasse végétale. En outre, ce travail nous a permis de quantifier les composés phénoliques en utilisant les techniques universelles appropriées de ces composés (teneur total des polyphénols, activité antioxydante) contenus dans le marc de raisin.

Deux aspects principaux sont visés par ce travail, le premier était l'extraction des composés 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 test in vivo pour une inflammation intestinale.

Dans ce travail des microbilles (Alginate/polyphénols) ont été synthétisées et ont été caractérisées. Les résultats d'analyse FT-IR ont montré aucun changement, ni des positions des pics ni de leurs intensités. Cela indique qu'il n'y a pas d'interactions entre le PA et la matrice polymère. En effet, les spectres IR nous ont permis de retrouver tous les pics caractéristiques du PA. Cela rend compte de l'efficacité d'encapsulation du PA. D'après les résultats de la dissolution, nous avons constaté que la vitesse de libération du PA est proportionnelle à la quantité du polymère incorporée. Plus la formulation est concentrée en masse du polymère, plus la vitesse de libération du PA augmente, cela nous a mené de suivre notre étude avec une quantité de 2% de polymère.

L'analyse par le microscope optique nous a montré que les microbilles obtenues sont relativement homogènes en taille, de forme sphérique d'un diamètre de  $41227,04\mu\text{m}$  pour les microbilles humides et de  $34795,2\mu\text{m}$  pour les microbilles sèches. Le taux d'humidité des microbilles gélifiées des différentes doses du polyphénol est environ 95% celui-ci

montre que la réaction de réticulation de l'alginate est totale. Pour Les densités des microbilles elles sont supérieures à celle de l'eau ( $0.998 \text{ g.cm}^{-3}$ ) ce qui explique leurs émergences dans la solution aqueuse. Les tests rhéologiques effectuées aux différentes températures ne montrent pas de variation du module de conservation et donc du comportement rhéologique de la microbille, on peut dire, ainsi, que les microbilles sont stables thermiquement.

L'effet anti-inflammatoire intestinal de l'extrait phénolique a été confirmé après l'évaluation histologique des échantillons du côlon, car le traitement favorise la régénération des tissus de l'épithélium intestinale et la réduction du rapport poids/longueur du colon.

D'après cette étude, nous avons conclu que les doses 23 et 16,5 mg ont donné un meilleur effet thérapeutique par rapport à la dose minimale de 10 mg.

Cependant, cela reste une étude préliminaire qui nécessite des études complémentaires et approfondies dont de nombreuses perspectives peuvent être envisagé. Ces perspectives se résument par :

- Poursuivre cette étude en minimisant la dose utilisée entre 16,5 et 10 mg.
- Augmenter le nombre de lots des souris pour avoir des résultats plus significatifs.
- Effectuer des tests complémentaires sur la caractérisation des microbilles comme : analyse thermogravimétrique (ATG).
- Effectuer des tests complémentaires sur l'identification des polyphénols comme : la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), chromatographie à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LCMS).
- Tester l'extrait phénolique sur d'autres types de maladies d'inflammation intestinale.
- Essayer d'autres agents ulcérogènes pour comparer leurs effets avec l'acide acétique.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Brajdić, A., & Mijandrušić-Sinčić, B. (2012). Insights to the Ethiopathogenesis of the Inflammatory Bowel Disease. In *Inflammatory Bowel Disease*. IntechOpen.
- [2] Hendrickson, B. A., Gokhale, R., & Cho, J. H. (2002). Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clinical microbiology reviews*, 15(1), 79-94.
- [3] Kornbluth et Sachar, 2010
- [4] Liu, D. Y., Guan, Y. M., et al., (2012). « The protective and healing effects of Si Shen Wan in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. » *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 435-440.
- [5] Mishra, S. K., Kang, J. H., Kim, D. K., Oh, S. H., & Kim, M. K. (2012). Orally administered aqueous extract of *Inonotus obliquus* ameliorates acute inflammation in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 524-532.
- [6] Habauzit, V., & Morand, C. (2012). Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Therapeutic advances in chronic disease*, 3(2), 87-106.
- [7] Vandamme, T., Denis Poncelet, Pascale Subra-Paternault. 2007. *La microencapsulation : des sciences aux technologies*. Edition Lavoisier. 348p.
- [8] : Olivier I. Les tissus adipeux mésentériques et le tissu rampant dans l'inflammation intestinale : Description et implication physiopathologique. Thèse de physiopathologie. Université de Toulouse 2011 ; n°1318.
- [9] : Brajdic, A. (2012). « Inflammatory bowel disease. » In : *Insights to Ethiopathogenesis of the Inflammatory Bowel Disease*. Croatia, InTech : p1-21.
- [10] : Russel, M. G. et al. Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. *Inflamm. Bowel Dis.* 4, 182–186 (1998).
- [11] : Regueiro M et al. Infliximab prevents Crohn's disease recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 2009 ;136 : 441–50
- [12] : The Johns Hopkins Medical Institutions. *Gastroenterology & Hepatology Resource Cente*
- [13] : Kornbluth, A. & Sachar, D. B. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 501–523 ; quiz 524 (2010).

- [14] : The Johns Hopkins Medical Institutions. Gastroenterology & Hepatology Resource Center
- [15] : Schumacher, G., Kollberg, B. & Sandstedt, B. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Histologic course during the 1st year after presentation. *Scand. J. Gastroenterol.* 29, 318–332 (1994).
- [16] : Yantiss, R. K. & Odze, R. D. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology* 48, 116–132 (2006).
- [17] : BENLADGHEM, S. La maladie de crohn et les antis TNF alfa (2015).
- [18] : Colombel, J. F., Sandborn, et al. (2010). « Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. » *New England Journal of Medicine*, 362(15), 1383-1395.
- [19] : Martin, A. R., I. Villegas, et al., (2004). « Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. » *Biochem Pharmacol* 67(7) : 1399-140.
- [20] DeMichele, J., Rezaizadeh, H., & Goldstein, J. I. (2012). Sulfasalazine crystalluria-induced anuric renal failure. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(2), 32.
- [21] Elliott, P. R., Powell-Tuck, J., Gillespie, P. E., Laidlow, J. M., Lennard-Jones, J. E., English, J., Chakraborty, J., & Marks, V. (1980). Prednisolone absorption in acute colitis. *Gut*, 21(1), 49-51.
- [22] Khan, K. J., Dubinsky, M. C., Ford, A. C., Ullman, T. A., Talley, N. J., & Moayyedi, P. (2011). Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 106(4), 630-642.
- [23] Allez, M. (2008). « Utilisation pratique des anticorps monoclonaux anti-TNF au cours des maladies inflammatoires de l'intestin. » *Gastroenterologie clinique et biologique*, 32, 467-477.
- [24] Hanauer, S. B. et Present, D. H. (2002). The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. *Reviews in Gastroenterological Disorders*, 3(2), 81-92.
- [25] Parkes, M., Barrett, J. C., et al. (2007). « Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics*, 39(7), 830-832.)
- [26] Liu, D. Y., Guan, et al. (2012). « The protective and healing effects of Si Shen Wan in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. » *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 435-440.
- [27] Louis, E., Van Kemseke, C., Latour, P., Belaiche, J., & Reenaers, C. (2012). « Génétique et environnement dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. » *Revue Médicale de Liège*, 67(5-6), 298-304

- [28] [www.mauxdeventre.org](http://www.mauxdeventre.org) Société GI Maladie inflammatoire de l'intestin (MII)
- [29] Maloy, K. J. et Powrie, F. (2011). « Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. » *Nature*, 474(7351), 298-306.
- [30] Scalbert, A. C. Manach, et al. (2005). « Dietary polyphenols and the prevention of diseases. » *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(4) : 287-306.
- [31] magrone, T., G. Candore, et al. (2008). « Polyphenols from red wine modulate immune responsiveness : biological and clinical significance. » *Curr Pharm Des* 14(26) : 2733-2748.
- [32] Ben Lagha, (2019) « Effets préventifs et thérapeutiques des polyphénols dans des modèles in vitro de la maladie parodontale »
- [33] D'Archivio, M., C. Filesi, et al. (2007). « polyphenols, dietary sources and bioavailability. » *Ann Ist Super Sanita* 43(4) : 348-361.
- [34]; Tsao, R. (2010). « Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. » *Nutrients* 2(12) : 1231-1246.
- [35] Crozier, R., I. B. Jaganath, et al. (2009). « Dietary phenolics : chemistry, bioavailability and effects on health. » *Nat Prod Rep* 26 (8) : 1001-1043.
- [36] Manach, C., A. Scalbert, et al. (2004). « Polyphenols food sources and bioavailability. » *Am J Clin Nutr* 79(5) : 727-747.
- [37] Boussenna. A. (2015) « Effets protecteurs d'extraits de marc de raisin riches en polyphénols dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. » *Médecine humaine et pathologie*. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I.
- [38] Crespy, V., C. Morand, et al. (2001). « Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. » *J Nutr* 131(8) : 2109-2114.
- [39] Vislocky, L. M. and M. L. Fernandez (2010). « Biomedical effects of grape products. » *Nutr. Rev.* 68(11) : 867-878.
- [40] Xia, E. G., G. F. Deng et al. (2010). « Biological activities of polyphenols from grapes. » *Int J Mol Sci* 11(2) : 622-646
- [41] Zoecklein, B. C., K. C. Fugelsang, et al. (1995). *Wine analysis and production*. New York, Chapman & Hall : p99-208.
- [42] Teixeira, A., J. Eiras-Dias, et al. (2013). « Berry phenolics of grapevine under challenging environments. » *Int J Mol Sci* 14(9) : 18711-18739.
- [43] Chira K., Suh I.-H., et al. (2008). « Les polyphenols du raisin. » *Phytotherapie* 6 :75-82.
- [44] Shi, J., J.Yu, et al. (2003). « Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. » *J Med Food* 6(4) : 291-299.

- [45] He, J. J., Y. X. Liu, et al. (2010). « Different anthocyanin profiles of skin and the pulp of Yan7 (Muscat Hamburg x Alicante Bouschet) grape berries. » *Molecules* 15(1) : 1141-1153.
- [46] Yang, J., and Y. Y. Xiao (2013). « Grape phytochemicals and associated health benefits. » *Crit Rev Food Sci Nutr* 53(11) : 1202-1225.
- [47] Georgiev, V., A. Ananga, et al. (2014). « Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. » *Nutrients* 6(1) : 391-15.
- [48] Downey, M. O., J. S. Harvey, et al. (2003). « Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). » *Inflamm Bowl Dis* 19(9) : 1904-1912.
- [49] Cantos, E., J. C. Espin, et al. (2002). « Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. » *J Agric Food Chem* 50(20) : 5691-5696.
- [50] Flamini, R., F. Mattivi, et al. (2013). « Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics : anthocyanins, stilbenes and flavonols. » *Int J Mol Sci* 14(10) : 19651-19669.
- [51] Castillo-Munoz, N., S. Gomez-Alonso, et al. (2007). « Flavonol profiles of *vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. » *J Agric Food Chem* 55(3) : 992-1002.
- [52] Adams, O. D. (2006). « Phenolics and ripening in grape berries. » *Am. J. Enol. Vitic* 57 (3) : 249-256.
- [53] Ali, K., F. Maltese, et al. (2010). « Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. » *Phytochem Rev* 9(3) : 357-378.
- [54] This, P., T. Lacombe, et al. (2006). « Historical origins and genetic diversity of wine grapes. » *Trends Genet* 22(9) : 511-519.
- [55] Ky, I. and P. L. Teissedre (2015). « Characterisation of mediterranean grape pomace seed and skin extracts : polyphenolic content and antioxidant activity. » *Molecules* 20(2) : 2190-2207.
- [56] Ruberto, G., A. Renda, et. (2007). « Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. » *FOOD CHEM* 100(1) : 203-2010.
- [57] Ky, I., B.Lorrain, et al. (2013). « Wine by-products : phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. » *Molecules* 19 (1) : 482-506.
- [58] Kammerer, D., A. Claus, et al. (2004). « Polyphenol profiling of pomace from red and white grape varieties (*vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. » *J Agric Food Chem* 52(14) : 4360-4367.



- [59] Romier, B., Y. J. Schneider, et al. (2009). « Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. » *Nutr Rev* 67(7) : 363-378.
- [60] Hollebeeck, S., J. Winard, et al. (2012). « Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) hysk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of humen intestine. » *Food Funct* 3(8) : 875-885.
- [61] Sergent, T., N. Piront, et al. (2010). « Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds 188(3) : 659-667.
- [62] Netsh, M. I., H. Gutmann, et al. (2006). « Green tea extract induces interleukin-8 (IL-8) mRNA and protein experssion but specifically inhibits IL-8 sexretion in caco-2 cells. » *Planta Med* 72(8) : 697-702.
- [63] Nicod, N., G. Chiva-Blanch, et al. (2014). « Green tea, cocoa, and red wine polyphenols moderately modulate intestinal inflammation and do not increase high-density lopoprotein (HDL) production. » *J Agric Food Chem* 6(10) : 2228-2232.
- [64] Panaro, M. A., V. Carofigio, et al. (2012). « Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells. » *Br J Nutr* 108(9) : 1623-1632
- [65] Nunes, C., E. Ferreira, et al. (2013). « Intestinam anti-inflammatory activity of red wine extract : unveiling the mechanisms in colonic epithelial cells. » *Food Funct* 4(3) : 373-383.
- [66] Giner, E., I. Andujar, et al. (2011). « Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. » *J Agric Food Chem* 59(24) : 12882-12892.
- [67] Trivedi, P. P. and G. B. Jena (2012). « Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to increased hematopoiesis and indices both local as well as systemic genotoxicity in mice. » *Mutat Res* 744(2) : 172-183.
- [68] Cianciulli, A., R. Calvello, et al. (2012). « Modulation of NF-kappaB activation by resveratrol in LPS treated human intestinal cells results in downregulation of PGE2 production and COX-2 expression. » *Toxicol In Vitro* 26(7) : 1122-1128.
- [69] Denis, M. C., A. Furtos, et al. (2013). « Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. » *PLoS One* 8(1) : e53725.
- [70] Rizza, L., G. Frasca, et al. (2012). « Caco-2 cell line as a model to evaluate mucoprotective proprieties. » *Int J Pharm* 42251-2) : 318-322.
- [71] D'Archivio, M., C. Filesi, et al. (2010). « Bioavailability of the polyphenols : status and controversies. » *Int K Mol Sci* 11(4) : 1321-1342.
- [72] Saura-Calixto F., José Serrano, et al. (2007). « Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. » *Food Chem.* 101(2) : 492-501.

- [73] Scalbert, A., S. Deprez, et al. (2000). « Proanthocyanidins and human health : systemic effects and local effects in the gut. » *Biofactors* 13(1-4) : 115-120.
- [74] Shimizu M. (2010) « Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci Biotechnol Biochem* » 74 :232-41
- [75] Zhou J, Windsor LJ. « Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. » *J Periodontal Res.* Feb 2006;41(1):47-54
- [76] Yucel-Lindberg T, Bage T. « Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. » *Expert Rev Mol Med.* Aug 5 2013 ;15:e7
- [77] Darveau RP. Periodontitis : « a polymicrobial disruption of host homeostasis. » *Nat. Rev. Microbiol.* Jul 2010 ;8(7) :481-490
- [78] Rizzo A, Bevilacqua N, Guida L, Annunziata M, Romano Carratelli C, Paolillo R. « Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. *Cytokine.* » Oct 2012 ;60(1) :197-204
- [79] Chung SW, Kang BY, Kim SH, et al. « Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa » *B. J. Biol. Chem.* Oct 20 2000 ;275(42) :32681-32687
- [80] Martin H. Role of PPAR-gamma in inflammation. » *Prospects for therapeutic intervention by food components.* » *Mutat. Res.* Aug 7 2010 ;690(1-2) :57-63
- [81] . Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361e1394.
- [82] Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213e224
- [83] Z. Fang, B. Bhandari / *Trends in Food Science & Technology* 21 (2010) 510e523
- [84] M.-C. V.-J. Jean-Pierre BENOÎT, Joël RICHARD, (2013) « Microencapsulation, » *Tech. L'ingénieur.*
- [85] Barras, A. Mezzetti, A, Richard A lazzaroni, S, Roux, S Melnyk (2009). « Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules: international journal of pharmaceuticals »
- [86] Finch, C.A., Bodmeier, R. (2005). « Microencapsulation, » *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* 10.1002/14356007.a16\_575.
- [87] VLADISAVLJEVIC, G.T. and HOLDICH, R.G. (2012). « Formulation by membrane emulsification. » IN : Drioli, E. and Giorno, L. (eds). *Encyclopedia of Membranes.* Heidelberg : Springer


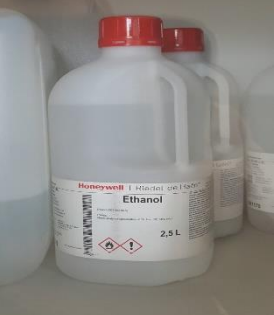

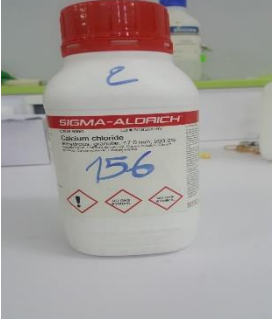
- [88] N. C. Esposito E., Cortesi R., “Production of lipospheres for bioactive compound delivery. In : Lipospheres in drug targets and delivery: Approaches, methods and applications, Nastruzzi C. (Ed), 23-40,” 2005
- [89] M.-C. V.-J. Jean-Pierre BENOÎT, Joël RICHARD (2013) “Microencapsulation,” Tech. L’ingénieur.
- [90] “microparticule.” [Online]. Available : <https://tpe-microcapsules-fr.webnode.fr/quest-ce-quune-microcapsule-/>.
- [91] KHOUKHI Oum EIKheir (2017) « Modification physico-chimique de matrices polymerique par les procédés de micro-encapsulation pour la libération contrôlée du piroxicam » 2017
- [92] Singleton.V. L ; Rossi.J. A, (1965) « Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. » American Journal of Enology and Viticulture, 16 : 144-158.
- [93] Parejo, I ; Viladomat, F ; Bastida, J ; Rosas-Romero, A ; Flerlage, N ; Burillo,J; Codina C., (2002). « Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six disteled and nondisteledMediterranean herbs and aromatic plants. » Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 6882-6890.
- [94] Deladino, et al. (2015) « Encapsulation of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content »
- [95] Zemmouri H., (2008) : « le chitosane ... est-il la molécule du siècle ? ». Bulletin des Energies Renouvelables. p. 3.
- [96] Prabhu, V. et Guruvayoorappan, C. (2014). « Protective effect of marine mangrove Rhizophora apiculata on acetic acid induced experimental colitis by regulating antioxidant enzymes, inflammatory mediators and nuclear factor-kappa B subunits. » International Immunopharmacology, 18(1), 124-134.
- [97] Rafael Apolinar-Valiente, Inmaculada Romero-Cascales, Encarna Gmez-Plaza, José Maria Lopez-Roca, José Maria Ros-Garcia “Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques” Food Chemistry 187 (2015) 89–97
- [98] Ghafoor, K., Park, J., Choi, Y.H., (2010). Optimization of supercritical fluid extractionof bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using responsesurface methodology. JT Innov. Food Sci. Emer. Technol. 11, 485–490.
- [99] Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. Food Research International, 44, 2712–2720.

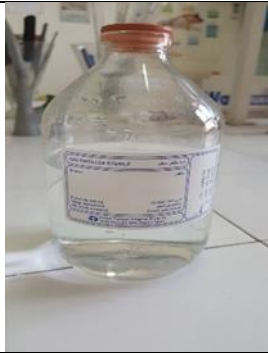
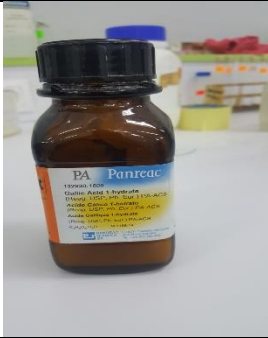


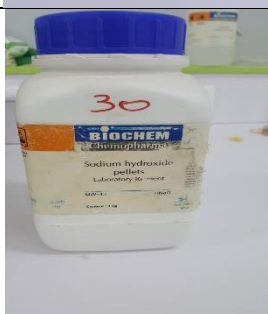
- [100] Tseng, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138, 356–365.
- [101] Dugald C., Closea B.C., Arthura B.L., Pietrzykowskia E. et Patersona S., (2004). Evaluating effects of nursery and post-planting nutrient regimes on leaf chemistry and browsing of eucalypt seedlings in plantations. *Forest Ecology and Management*. 200,101-112.
- [102] Braccini . I ;R.P. Grano et S. Perez : « Conformational and configurational feautres of acedic polysaccharides and their interation with calcium ions : a molecular modeling investigation » *Carbohy . Res .* 317,(1999), (1-4), 119-130.
- [103] Julie Vaysse-Dufaure, « Apport de la Résonance Magnétique Nucléaire pour le contrôle et la qualité de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires », thèse doctorat en Chimie - Biologie – Santé, Université de Toulouse, (2011).
- [104] wahl, c., Liptay, S., Adler, G. and Schmid, M. R. (1998). Sulfasazine : a pontet and specific inhibitor of nulear Kappa B. *the american society for clinical investigation, Inc*, Vol 101 n°5 : 1163-1174
- [105] Andééva- Gatéva P. (2003). Récepteurs activables par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR) : leur implication dans le métabolisme des hydrates de carbone et des lipides. *Laboratoire central clinique et lipidologie clinique*. 61 :295-6.
- [106] Thippeswamy, B. S. , Mahendran, S. , Biradar , M . I . , Raj , P. , Srivastava , K. , Badami , S. &Veerapur , V . P. (2011) . protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitiss in rat . *Europeen journal of pharmacologiy*, 654 (1) , 100-105.
- [107] Sakthivel , K . M. et Guruvayoorappan , C. (2013). Amentoflavone nihibts iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NK-kB signal tranduction pathways in rats with ulcirative clitis . *International Immunopharmacology*, 17 (3) : 907-916.
- [108] Larrosa, M., Yañez-Gascón, M. J., Selma, M. V., Gonzalez-Sarrias, A., Toti, S., Cerón, J. J., ... & Espín, J. C. (2009). Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(6), 2211-2220.
- [109] Li, X. L., Cai, Y. Q., Qin, H., & Wu, Y. J. (2008). Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 86(12), 841-849.
- [110] Cheah, K. Y., Bastian, S. E., Acott, T. M., Abimosleh, S. M., Lymn, K. A., & Howarth, G. S. (2013). Grape seed extract reduces the severity of selected disease markers in the proximal colon of dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*, 58(4), 970-977.


[111] Piberger, H., Oehme, A., Hofmann, C., Dreiseitel, A., Sand, P. G., Obermeier, F., ... & Rogler, G. (2011). Bilberries and their anthocyanins ameliorate experimental colitis. *Molecular nutrition & food research*, 55(11), 1724-1729.

# ANNEXES




### Annexe 01 : Produits utilisés en extraction et formulation

Reactif	Marque	Photographie
Marc de raisin		
Ethanol à 100%	HoneyWell®	
Alginate de Sodium (medium viscosity)	ACROS ORGANICS®	
Chlorure de calcium	SIGMA-ALDRICH®	







<p>Eau distillée</p>	<p>Institut pasteur d'Algérie®</p>	
<p>Acide gallique</p>	<p>Panreac®</p>	
<p>Folin- Ciocalteu</p>	<p>Panreac®</p>	
<p>Carbonate de sodium</p>	<p>Gerhard Buchmann GmbH®</p>	
<p>Hydroxyde de sodium</p>	<p>BIOCHEM®</p>	





Dihydrogénophosphate de potassium	BIOCHEM®	
-----------------------------------	----------	---

**Annexe 02 : appareillage utilisé en extraction et formulation**



Appareillage	Marque	Photographie
Bain ultrason	Elmasonic®	
Centrifugeuse	SIGMA®	
Lyophilisateur	CHRIST®	




<p>Balance</p>	<p>OHAUS ADVENTURER®</p>	
<p>Agitateur</p>	<p>VELP SCIENTIFICA®</p>	
<p>Homogénéisateur</p>	<p>WISESTIR®</p>	
<p>Pompe péristaltique</p>	<p>THERMO SCIENTIFIC®</p>	
<p>Pompe sous vide</p>	<p>PRO-LAX™</p>	
<p>Etuve</p>	<p>memmert®</p>	




<p>Rot vapeur</p>	<p>HANVAPOR®</p>	
<p>UV-Visible</p>	<p>SCHIMADZU 1800®</p>	
<p>Dissolutest</p>	<p>ERWEKA®</p>	
<p>Microscope optique</p>	<p>OPTIKA®</p>	




### Annexe 03 : produits utilisés dans l'étude in vivo

Produits	Marque	Photographie
Acide acétique	SIGMA-ALDRICH®	
Sulfasalazine 500 mg	PFIZER®	



<p>Eau distillée</p>	<p>Institut pasteur d'Algérie®</p>	
<p>Huile de vaseline</p>	<p>Institut pasteur d'Algérie®</p>	
<p>Formol (formaldehyde) à 37-38%</p>	<p>Panreac®</p>	
<p>Ether</p>	<p>SIGMA-ALDRICH®</p>	
<p>Alcool à 90°</p>	<p>Cosmania®</p>	



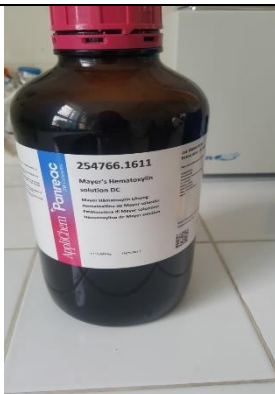

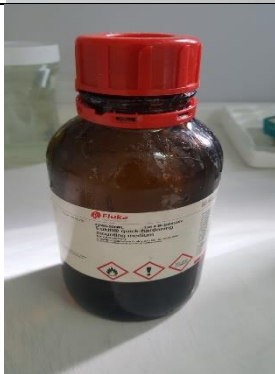
**Annexe 04 : Matériels utilisés dans l'étude in vivo**

Matériels	Marque	Photographie
Vortex	JANKE & KUNKEL IKA® labortechnik	
Tube en polypropylène diamètre 2 millimètre	IMPROVE®	
Sonde gastrique		

<p>Seringue</p>	<p>SOFT-JECT®</p>	
<p>Matériel de dissection</p>		
<p>Cloche</p>		


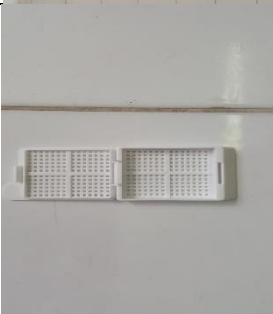
**Annexe 05 : réactifs utilisés en histopathologie**




<b>Reactif</b>	<b>Marque</b>	<b>Photographie</b>
Alcool à 90°	Cosmania®	
Ethanol	Honeywell®	





<p>Xylène</p>	<p>CARLO ERBA®</p>	
<p>Paraffine</p>	<p>Panreac®</p>	
<p>Hématoxyline de HARRIS</p>	<p>Panreac®</p>	
<p>Eosine</p>	<p>Panreac ®</p>	
<p>Eukitt : Resine synthetique de montage</p>	<p>Fluka®</p>	



### Annexe 06 : Matériels utilisés en histopathologie

Matériel	Marque	Photographie
Hotte chimique pour la macroscopie et le montage	Chem Fast®	 Une hotte chimique ChemFAST de couleur bleue avec une vitre de protection. À l'intérieur, on voit divers récipients et équipements de laboratoire.
Cassettes pour l'inclusion	MARIENFELD®	 Deux cassettes blanches à mailles métalliques, utilisées pour l'inclusion histologique.

<p>Automate de circulation</p>	<p>Slee®</p>	
<p>Station d'enrobage</p>	<p>Slee®</p>	
<p>Moule pour l'inclusion</p>		
<p>Microtome</p>	<p>Leica®</p>	
<p>Bain marie</p>	<p>NÜVE BATH®</p>	

Etuve ventilée	VWR®	
Lames en verre porte objet	ISO LAB®	
Panier porte lames		
Microscope optique à camera pour les photos	OLYMPUS CX23® CANON®	

### Annexe 07 : Symptomatologies des souris

#### a) Les polyphénols 10mg :

Jour	1	2	3	4	5	6	7
Symptômes	Une douleur forte Diarrhée forte	Une douleur forte Une diarrhée forte Chute de poils	Diarrhée forte Chute de poils	Selles molles Chute de poils	Selle un peu molles	Selle un peu molles	Selles normales

#### b) Les polyphénols 16.5mg :

Jour	1	2	3	4	5	6	7
Symptômes	Une douleur	Une douleur	Selles molles	Selles normales	Selles normales	Selles normales	Selles normales

	forte Diarrhée forte	forte Une diarrhée forte Chute de poils	Chute de poils				
--	----------------------------	--	-------------------	--	--	--	--

c) Les polyphénols 23mg :

Jour	1	2	3	4	5	6	7
Symptômes	Une douleur forte Diarrhée forte	Une douleur forte Une diarrhée forte Chute de poils	Selles molles Chute de poils	Selles normales	Selles normales	Selles normales	Selles normales

d) Le médicament de référence :

Jour	1	2	3	4	5	6	7
Symptômes	Une douleur forte Diarrhée forte	Une douleur forte Une diarrhée forte Chute de poils	Selles molles Chute de poils 1/3 gonflement abdominal	Selles normales	Selles normales	Selles normales	Selles normales

**Annexe 08 : Evolution pondérale des souris**

a. Les polyphénols 10mg :

Jour	0	1	2	3	4	5	6	7
La dose (mg)								
10	25.41g	24.83g	23.83g	23.85g				
	25.14g	24.21g	24.83g	24.97g	25.56g	25.49g		
	26.90g	25.89g	26.38g	25.96g	25.39g	26.30g	26.09	26.15g

b. Les polyphénols 16.5mg

Jour La dose (mg)	0	1	2	3	4	5	6	7
16.5	27.76g	26.94g	26.00g	26.67g				
	30.76g	30.58g	28.50g	28.67g	29.18g	29.55g		
	29.55g	29.41g	27.65g	27.40g	27.93g	27.97g	28.78g	29.02g

c. Les polyphénols 23mg :

Jour La dose (mg)	0	1	2	3	4	5	6	7
23	29.80g	29.76g	28.30g	28.00g				
	28.35g	27.98g	28.04g	26.97g	26.73g	25.39g		
	29.65g	28.91g	29.50g	28.97g	27.76g	28.26g	28.73g	29.10g

d. Médicament de référence (sulfasalazine) :

jour la dose (mg)	0	1	2	3	4	5	6	7
500	28.95g	28.79g	27.78g	29.23g				
	28.00g	27.68g	26.83g	27.32	27.38g	27.01g		
	28.00g	28.13g	28.15g	28.04g	28.19g	27.63g	28.17g	28.25g

