

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité Pharmacotoxicologie



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'activité anti-Inflammatoire intestinale
d'un mélange antibiotique- alcaloïdes
de *Linum usitatissimum***

Présenté par :

ZITOUNI Chems & SENDJAKEDINE Lydia

Soutenu le : 04 juillet 2024

Devant le jury composé de :

M^{me} ABDERRAHIM. S

MCA

Présidente

M^r BRIBI. N

Professeur

Encadrant

M^{me} OUAHMED. H

MCB

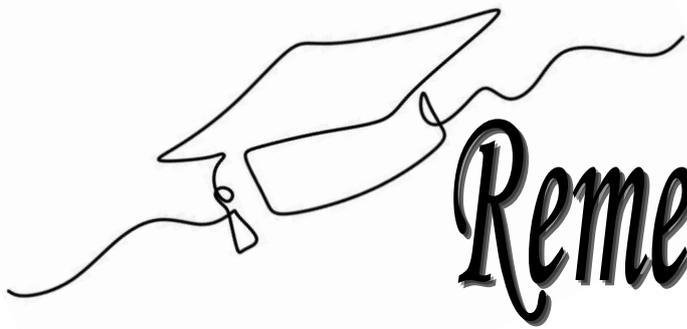
Examinatrice

M^r MERAKEB. MS

Doctorant

Invité

Année universitaire 2023 / 2024



Remerciements

A l'issue de ce travail, on tient tout d'abord à remercier « le bon Dieu » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la santé pour achever ce travail.

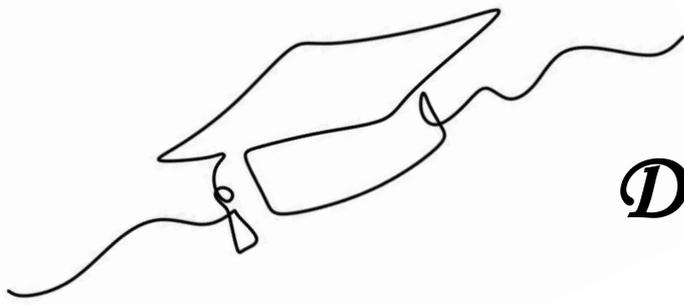
*Nos sincères remerciements vont à notre promoteur **Mr BRIBI. N** pour l'accueil qu'il nous a accordé dans son laboratoire, pour ses conseils précieux, pour ses orientations, pour sa gentillesse et pour sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*On remercie vivement les membres du jury **M^{me} ABDEERAHIM. S** de nous avoir fait l'honneur de présider notre jury et **M^{me} OUAHMED. H** d'avoir examiné notre travail.*

*On tient à remercier aussi très chaleureusement les doctorants (**Mohamed, Meriem et Nawel**) pour leur aide, leur soutien et leurs encouragements.*

Enfin, nous remercions profondément toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicaces

En signe de respect et de reconnaissance je dédie ce modeste travail :

Tout d'abord et avant tout à l'être la plus chers au monde :

*À la mémoire de **ma très chère mère** que la clémence de Dieu soit sur elle et l'accueillait dans son vaste paradis. Maman même si t'es pas là mais ton existence est éternelle dans mon cœur, grasse à toi je suis arrivée là, merci.*

*À ceux qui n'ont jamais cessé de m'encourager et de m'apporter leur soutien depuis toujours, et qui m'ont appris que la patience est la clé de succès et de la réussite à mes grands-parents **BEHIDJA** et **HAMOU**. Que dieu vous protège, une langue vie inchallah.*

*À ma chère sœur **AYACHA** et ses enfants **MOHAMED**, **HAMZA** et **ALAA**
Merci pour ton amour, ta confiance et ton encouragement.*

*À ma chère tante **DAHBIJA** et ses enfants **AMINE**, **SIFEDDINE** et **SALSABIL**.*

*À mes chers oncles **ABDLAKRIM**, **SALIM** et **MUSTAPHA**.*

*À la mémoire de mon cher oncle **ADEL** que dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

*À mon cher oncle **ABDESLAM** et ses enfants **AYMANE**, **BAD EDDINE** et **ABDERAHMANE**.*

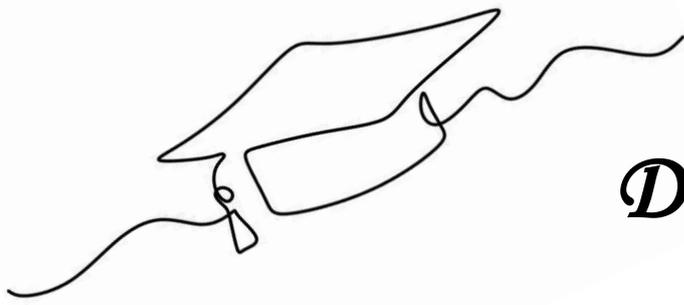
*À mon **PÈRE**.*

*À ma chère sœur, copine et ma binôme **LYDIA** et toute sa famille.*

*À mes chères amies **SARA**, **SOUSSOU**, **CHAHIRA** et **HANIA**.*



CHEMS



Dédicaces

Je dédie ce travail :

A moi

*A mes chers parents **Mouhoubé** et **Karima** : Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour*

éternel et ma considération pour les 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 portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Je vous aime

*A mes chers frères **linda** et **Ghiles***

*A la personne la plus chère à mon cœur **MIMI** qui n'a jamais cessé de m'encourager et de m'apporter son soutien depuis toujours, et qui m'a appris que la patience est la clé de succès et de la réussite.*

*A ma grand-mère **Taous**, mes tantes **Djamila** et **Fatima**, ma cousine **Nesrine** et ses deux filles **Nourssine** et **Eline**.*

*A ma chère copine d'enfance **Amel** malgré la distance rien ne nous sépare.*

*A ma chère sœur, copine et ma binôme **Chemoussa** et toute sa famille.*



LYDIA

Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1
CHAPITRE I : Synthèse bibliographique	
I. Les maladies inflammatoires chronique de l'intestin	2
I.1 Maladie de Crohn	3
I.2 La rectocolite hémorragique	3
I.3 Physiologie de la barrière intestinale	4
I.4 La physiopathologie des MICI	5
I.5 Facteurs de risques	5
I.6 Traitements	10
II. Généralités sur Les graines de lin	13
III. Les alcaloïdes	15
I.1 Classification des alcaloïdes	16
I.1 Propriétés physico-chimiques	17
I.2 Activités pharmacologiques	17
CHAPITRE II : Matériel et Méthodes	
II.1 Matériel	18
II.2 Méthodes	18
II.2.1 Extraction des alcaloïdes totaux de <i>Linum usitatissimum</i>	19
II.2.2 Etude de l'activité antiinflammatoire intestinale	20
II.2.3 Etude histologique	22
II.2.4 Etude biochimique	25
II.2.5 Analyse statistique	25
CHAPITRE III : Résultats et Discussion	
III.1 Résultats	26
III.1.1 Taux d'extraction des alcaloïdes totaux de <i>Linum usitatissimum</i>	26
III.1.2 Activité antiinflammatoire intestinale	26
III.1.3 Résultats de l'étude histologique	31
III.1.4 Résultats de l'étude biochimique	33
III.2 Discussion	34
Conclusion	38
Références bibliographiques	39
Annexes	

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Numéro de page
I	Différences entre la Maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH)	2
II	Composition de 100g des graines de <i>Linum usitatissimum</i>	15

La liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Numéro de la page
01	Localisation des atteintes digestives de la RCH	4
02	Altérations de la muqueuse intestinale en cas de MICI	7
03	Inhibition thérapeutique du TNF- α par les anticorps monoclonaux comme le remicade et l'adalimumab	11
04	Métabolisme et transport de l'azathioprine	12
05	Structure chimique de la doxycycline	13
06	Photographie de la plante de lin	14
07	Structure hétérocyclique du squelette constituant le groupe des alcaloïdes	16
08	Graines de lin (Photo original, animalerie FSNV, université de Bejaïa)	18
09	Photographie des souris BALB/c (Photo original, animalerie FSNV, université de Bejaïa)	18
10	Protocole d'extraction des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i>	19
11	Administration du DNBS par voie rectale chez des souris BALB/c	20
12	Administration des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> , la doxycycline et le mélange des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> et la doxycycline par voie orale	21
13	Protocole expérimentale pour l'induction de l'inflammation sub-chronique chez la souris	21
14	Différentes étapes de préparation des coupes histologiques	24
15	Effets des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50 mg/kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur l'évolution de la consommation de la nourriture par souri.	27
16	Effets des Alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50 mg/kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange Alcaloïdes <i>Linum usitatissimum</i> /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur l'évolution de la consommation de l'eau par souri.	27
17	Effets des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50 mg/kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes <i>Linum usitatissimum</i> /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur le DAI dans un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS chez les souris.	28
18	Morphologie générale des côlons contrôle non malade, contrôle malade, alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50 mg/kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes <i>Linum usitatissimum</i> /doxycycline (50 : 25 mg/kg) après l'induction de l'inflammation sub chronique par le DNBS.	29
19	Aspect macroscopique des côlons ouverts du groupe contrôle non	29

	malade, contrôle malade, alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes <i>Linum usitatissimum</i> /doxycycline (50 : 25 mg/kg) après l'induction de l'inflammation sub chronique par le DNBS.	
20	Effets des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes <i>Linum usitatissimum</i> /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur le rapport P/L dans un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS chez les souris.	30
21	Effet des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes <i>Linum usitatissimum</i> /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur l'aspect cellulaire dans un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS. Section histologique de la muqueuse colique colorée.	32
22	Effets des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes <i>Linum usitatissimum</i> /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur le taux du monoxyde d'azote (NO) et l'activité de la myéloperoxydase (MPO) dans un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS chez les souris.	33

List des abréviations

5-ASA : 5-aminosalicylique

6-MMP : 6-méthylmercaptapurine

6MP : 6-mercaptapurine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALU : Alcaloïdes

ALU/ATB : Alcaloïdes/Antibiotique

ARN : Acides ribonucléiques

ATB : Antibiotique

ATG16L1 : Autophagy related 16 like 1

AZA : Azathioprine

CARD15 : Caspase Recruitment domain-Containingprotein 15

COX : Cyclo-oxygénase

CRP : Protéine C- Réactive

DAI : Indice de l'activité de la maladie

DNBS : Acide 2,4-Dinitrobenzène Sulfonique

Do : longueur d'onde

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

GI : Gastro-intestinal

H2O2 : Peroxyde d'hydrogène

HE : Coloration hématoxyline éosine

HepG2 : Hepatocellular Carcinoma Cells

HGPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

HOCl : L'acide hypochloreux

HTAB : Hexadecyltrimethylammonium bromide

IFN γ : Interféron gamma

IgA : Immunoglobulin de type A

IL: Interleukin

LOX : Lypo-oxygénase

LTh : lymphocytes T helper

MC : Maladie de Crohn

MCF7 : lignée de cellules tumorales mammaires

MICI : Maladies inflammatoires chronique de l'intestin

MPO : Myéloperoxydase

MTX : Méthotrexate

NO : Monoxyde d'azote

NOD2 : Nucleotide-binding oligomerization domain 2

P/L : Poids /longueur

PMS : Surnagent post mitochondriales

RCH : Rectocolite hémorragique

SNP : Single nucleotide polymorphism(Polymorphismes de nucléotide unique)

T CD4+ : lymphocytes CD4+

TGF- β : Le facteur de croissance transformant

TGMP : Thioguanine monophosphate

TGNs : Thioguanine nucleotides

TIMP : Thioinosine monophosphate

TNBS : 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic acid

TNFSF15 : Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 15

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha.

TPMT : Thioguanine méthyltransférase

XO : Xanthine oxydase

Introduction

Introduction

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), incluant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, représentent un groupe de pathologies caractérisées par une inflammation persistante du tractus gastro-intestinales (**Ganorkar et Jain, 2013 ; Shim et al., 2014**). Ces maladies affectent des millions de personnes dans le monde et entraînent des symptômes débilitants tels que des douleurs abdominales, des diarrhées chroniques et une perte de poids. Les traitements actuels sont souvent associés à des effets secondaires significatifs et ne sont pas toujours efficaces pour tous les patients (**Seksik et al., 2004**).

Les traitements des MICI actuels visent principalement à réduire l'inflammation et à induire la rémission par des options thérapeutiques incluent les anti-inflammatoires et les immunosuppresseurs, mais ils ne sont pas toujours efficaces pour tous les patients. Face à ces défis, il existe un intérêt croissant pour les thérapies alternatives et complémentaires à base de plante médicinales riches en composés actifs, telles que les alcaloïdes, qui pourraient offrir une meilleure tolérance et moins d'effets indésirables qui sont utilisé seuls ou en association avec des médicaments conventionnels tels que les antibiotiques.

Les graines de lin (*Linum usitatissimum*) sont reconnues pour leurs nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé, incluant des effets anti-inflammatoires (**Palla et al., 2016**). Les alcaloïdes présents dans les graines de lin, bien que moins étudiés que d'autres composés comme les acides gras oméga-3 et les lignanes, ont montré un potentiel thérapeutique prometteurs (**Ganorkar et Jain, 2013 ; Shim et al., 2014**). Ces alcaloïdes pourraient exercer des effets anti-inflammatoires en modulant diverses voies biologiques impliquées dans l'inflammation intestinale (**Merakeb et al., 2022 ; Bribi et al., 2023**).

La doxycycline, un antibiotique de la classe des tétracyclines, est couramment utilisée pour ses propriétés antibactériennes. Toutefois, elle possède également des propriétés anti-inflammatoires, notamment par l'inhibition des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et la réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces caractéristiques rendent la doxycycline intéressante pour le traitement des MICI, au-delà de ses effets antimicrobiens (**Jacobs MR et al., 2004 ; Jones RN et al., 2004 ; Morrissey I et al., 2005**).

L'objectif de cette étude est d'explorer l'effet anti-inflammatoire intestinale de l'association des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* avec la doxycycline en combinant les propriétés bénéfiques des deux composés, afin de réduire et de contrôler la réponse inflammatoire pathologique au niveau de la muqueuse intestinale.

CHAPITRE I

Partie théorique

I. Maladies inflammatoires chroniques intestinales

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont les troubles inflammatoires Chroniques multifactorielles du tractus gastro-intestinal regroupent, entre autres, la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) (Szigethy *et al.*, 2011). Du fait de leur symptomatologie commune, caractérisée par une évolution par poussées, entrecoupées de périodes de rémissions. Elles sont parfois difficiles à distinguer l'une de l'autre. Cependant, la localisation des régions touchées ainsi que leur physiopathologie diffèrent. Ces deux maladies ont une intensité et une sévérité croissante avec le temps (Tableau I), cependant l'évolution de la MC est plus variable et plus imprévisible que celle de la RCH (Rowe et Lichtenstein, 2012).

Tableau I : Différences entre la Maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) (Rowe et Lichtenstein, 2012).

	MC	RCH
Segment du tube digestif concerné	N'importe lequel de la bouche à l'anus	Uniquement le gros intestin
Atteinte rectale	1 cas sur 2	Systématique
Atteinte anale	Fréquente	Jamais
Topographie des lésions	Discontinue	Ininterrompue
Histologie	Atteinte de toute l'épaisseur du tissu intestinal Présence de granulomes	Atteinte de la muqueuse uniquement Absence de granulomes
Saignements	Fréquents	Systématiques
Sténoses	Fréquentes	Peu communes
Fistules	Fréquentes	Jamais
Perte de poids	Fréquente	Rare

I.1 Maladie de Crohn

La Maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire transmurale qui peut toucher l'ensemble du tube digestif, de la bouche à l'anus (**Kinani, 2014**). Il existe typiquement une atteinte discontinue du tractus digestif plus ou moins associée au développement de complications (sténose, fistule, des fissures et abcès) observés chez la moitié des patients entraînant souvent une intervention chirurgicale. La symptomatologie est dominée par une diarrhée chronique associée à des douleurs abdominales ; le mode de début est le plus souvent progressif, plus rarement aigu. Des signes généraux (fièvre, anorexie, amaigrissement) sont souvent associés (**Hart et Ng, 2011**). Cette inflammation chronique résulte de la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires en réponse à une infection probable. Cela provoque une intensification de la cascade inflammatoire, entraînant la production de médiateurs inflammatoires, d'enzymes et de radicaux libres, menant à une destruction des tissus et aux symptômes caractéristiques de la maladie de Crohn. L'augmentation du taux de TNF- α induit la synthèse d'autres médiateurs inflammatoires, fragilisant la barrière épithéliale intestinale, permettant la pénétration des antigènes et déclenchant un processus inflammatoire chronique. Actuellement, la cause précise de la maladie de Crohn reste inconnue et semble résulter de multiples facteurs, incluant une prédisposition génétique, une composition spécifique du microbiote intestinal et un dysfonctionnement du système immunitaire. Par conséquent, cette maladie est considérée comme multifactorielle. Au niveau sanguin cette inflammation est marquée par hyper-leucocytose et une augmentation des protéines inflammatoires comme la Protéine C- Réactive (CRP) (**Zhang, 2014 ; Daline, 2016**).

I.2 Rectocolite hémorragique

La rectocolite hémorragique (RCH), également appelée colite ulcéreuse est une inflammation chronique de la muqueuse intestinale, d'étiologie inconnue, atteignant le recto-colon en partie ou en totalité (figure 01). Cette inflammation débute au niveau du rectum et évolue par poussées caractérisées par des émissions glairo-sanglantes (**Marifina et al., 2019**)

En fonction de l'extension des lésions au niveau du colon, il existe 3 types de RCH :

- Les rectocolites hémorragiques (RCH) distales peuvent toucher uniquement le rectum, ce qui est alors appelé rectite, ou s'étendre à la fois au rectum et au sigmoïde, cas dans lequel on parle de recto-sigmoïdite.
- Les RCH pancoliques, qui atteignent le rectum et la totalité du colon.

- Parfois, il s'agit d'une forme intermédiaire de la RCH avec des lésions étendues jusqu'au colon gauche (Louis *et al.*, 2010).

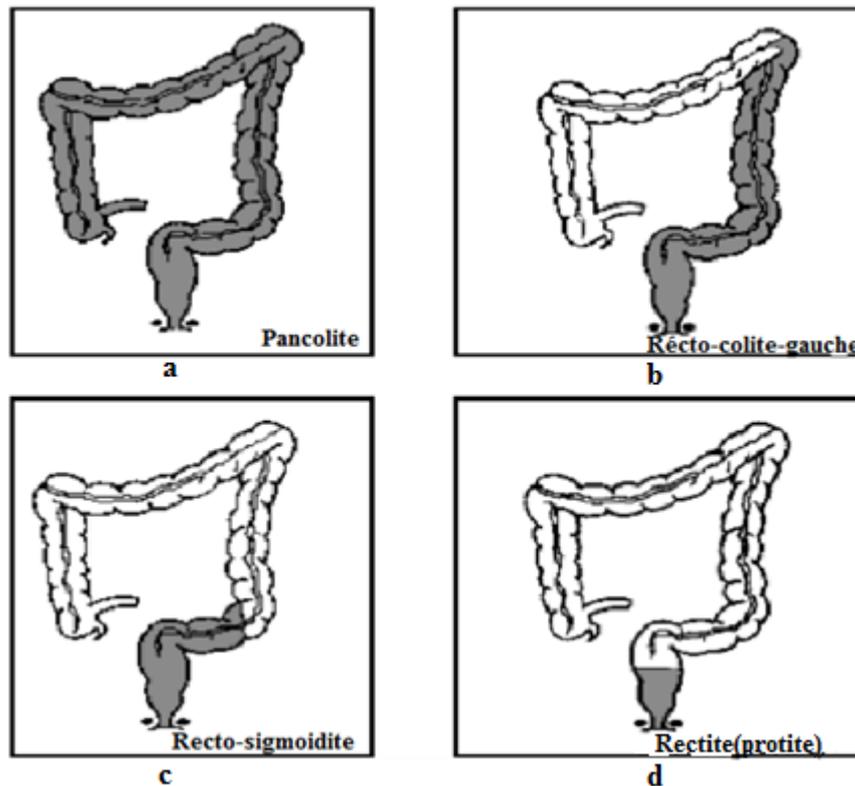


Figure 01: Localisation des atteintes digestives de la rectocolite hémorragique (Sinclair *et al.*, 2012).

a : Pancolite

b : Recto-sigmoidite

b : Récto-colite-gauche

c : Rectite (protite)

I.3 Physiologie de la barrière intestinale

La muqueuse épithéliale de l'intestin est essentielle en tant que première ligne de défense du système immunitaire. Des études antérieures ont établi des liens entre des dysfonctionnements dans la production de mucus et certaines maladies inflammatoires de l'intestin, telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (Xavier *et Podolsky*, 2007). La solidité de la barrière intestinale dépend largement des jonctions serrées entre les entérocytes, qui préviennent la pénétration de substances nocives dans l'intestin. De plus, la couche externe de mucus, principalement composée de mucine, joue un rôle crucial dans cette protection. Des variations dans le gène *muc2* ont également été identifiées comme des facteurs prédisposants chez les personnes atteintes de maladies inflammatoires de l'intestin (Anderson *et al.*, 2011). Divers facteurs peuvent accroître la perméabilité de cette barrière intestinale, notamment l'apoptose des cellules épithéliales intestinales, la perturbation des jonctions serrées et la formation d'ulcères. Cette altération de la barrière épithéliale intestinale

peut créer une "porte d'entrée" pour de nombreux micro-organismes, ions et autres molécules, ce qui contribue au déclenchement et au maintien de l'inflammation ainsi qu'à la diarrhée caractéristique des maladies inflammatoires de l'intestin (**Neurath, 2014**).

I.4 Physiopathologie des MICI

À ce jour, l'origine des MICI demeure inconnue. Toutefois, il est largement admis que ces affections résultent d'une combinaison complexe de facteurs multiples (**Kökten et al., 2016**). Des études approfondies ont révélé que les facteurs génétiques et environnementaux jouent un rôle crucial dans la survenue des MICI, bien que la cause principale de cette maladie n'ait pas encore été entièrement présentée. En 2005, Heyman et ses collaborateurs ont identifié deux principales causes des MICI :

1. Toute altération de la composition du microbiote intestinal ou perturbation de la fonction de l'épithélium entraîne une réaction pathologique dans le système muqueux sain.
2. Le déséquilibre du système muqueux conduit à une augmentation de la réponse immunitaire contre le microbiote humain.

La pathogénicité des MICI résulte de plusieurs facteurs, tels que la susceptibilité individuelle, l'immunité des muqueuses et la composition de la microflore intestinale. L'interaction complexe de ces éléments contribue au développement des MICI (**Podolsky, 2002**).

I.5 Facteurs de risques

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont influencées par divers facteurs de risque tels que les facteurs génétiques, environnementaux et immunologiques qui jouent un rôle crucial dans leur développement et progression.

I.5.1 Facteurs immunologiques

L'épithélium intestinal constitue une barrière multifonctionnelle essentielle entre la lumière intestinale et le milieu interne. Les cellules caliciformes produisent un mucus agissant comme une barrière physique et chimique contre les agents pathogènes, piégeant les micro-organismes (**McGuckin et al., 2009 ; Roda et al., 2010**), tandis que les cellules de Paneth synthétisent des peptides antimicrobiens facilitant la lyse des bactéries. Les jonctions serrées entre les cellules épithéliales rendent la muqueuse imperméable aux bactéries luminales, et une capacité de renouvellement élevée permet un remplacement rapide des cellules endommagées (**Alpan et al., 2001**). Les cellules de l'immunité innée, telles que les cellules

dendritiques et les macrophages, reconnaissent les antigènes pathogènes et activent la réponse immunitaire innée pour défendre contre une éventuelle invasion microbienne. Les bactéries intestinales sont détectées par les cellules M de l'épithélium intestinal, puis transmises aux cellules dendritiques dans le dôme sous-épithélial, permettant une élimination précoce des bactéries avant qu'elles ne provoquent une infection. Si les bactéries envahissent la muqueuse, leurs antigènes sont reconnus par les lymphocytes T dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin ou par les cellules dendritiques dans la lamina propria (**Mowat et al., 2003**). Les cellules dendritiques orchestrent la réponse immunitaire en présentant les antigènes aux lymphocytes T naïfs dans les ganglions lymphatiques, activant ainsi les lymphocytes B pour produire des IgA protectrices (figure 02). Les cellules épithéliales intestinales reconnaissent également les micro-organismes et présentent les antigènes aux lymphocytes T naïfs (**Smith et al., 2002**).

La reconnaissance des antigènes non pathogènes induit la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, favorisant la maturation des cellules dendritiques qui produisent de l'IL-10, différenciant les lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs. Ces derniers inhibent l'activation des lymphocytes T pro-inflammatoires et des macrophages, maintenant l'homéostasie intestinale et une tolérance fonctionnelle (**Maloy et al., 2011**).

Les patients atteints des MICI présentent souvent des altérations de leurs barrières intestinales, causées par des facteurs environnementaux et génétiques. Ces altérations incluent une diminution de la production de mucus et de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales, favorisant une dysbiose intestinale où les bactéries pathogènes prolifèrent au détriment des bactéries bénéfiques (**Manichanh et al., 2006**). De plus, ces altérations affectent les jonctions entre les cellules épithéliales, augmentant la perméabilité de la barrière intestinale. En conséquence, les bactéries pathogènes peuvent traverser cette barrière et déclencher une réponse immunitaire excessive, caractérisée par une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8. Contrairement à une muqueuse saine, cette inflammation chronique entraîne une maturation complète des cellules dendritiques, qui produisent alors des niveaux élevés d'IL-12 pro-inflammatoire au lieu d'IL-10. Cela favorise la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T effecteurs, tels que les LTh1, LTh2 et LTh17, qui amplifient l'inflammation en sécrétant davantage de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TGF- β , l'IL-4 et l'IL-17. Les LTh1 activent la réponse cellulaire, les LTh2 favorisent la réponse immunitaire humorale, et les LTh17 contribuent au recrutement des cellules de l'immunité innée, comme les neutrophiles, tout en intensifiant l'inflammation (**Gálvez, 2014**).

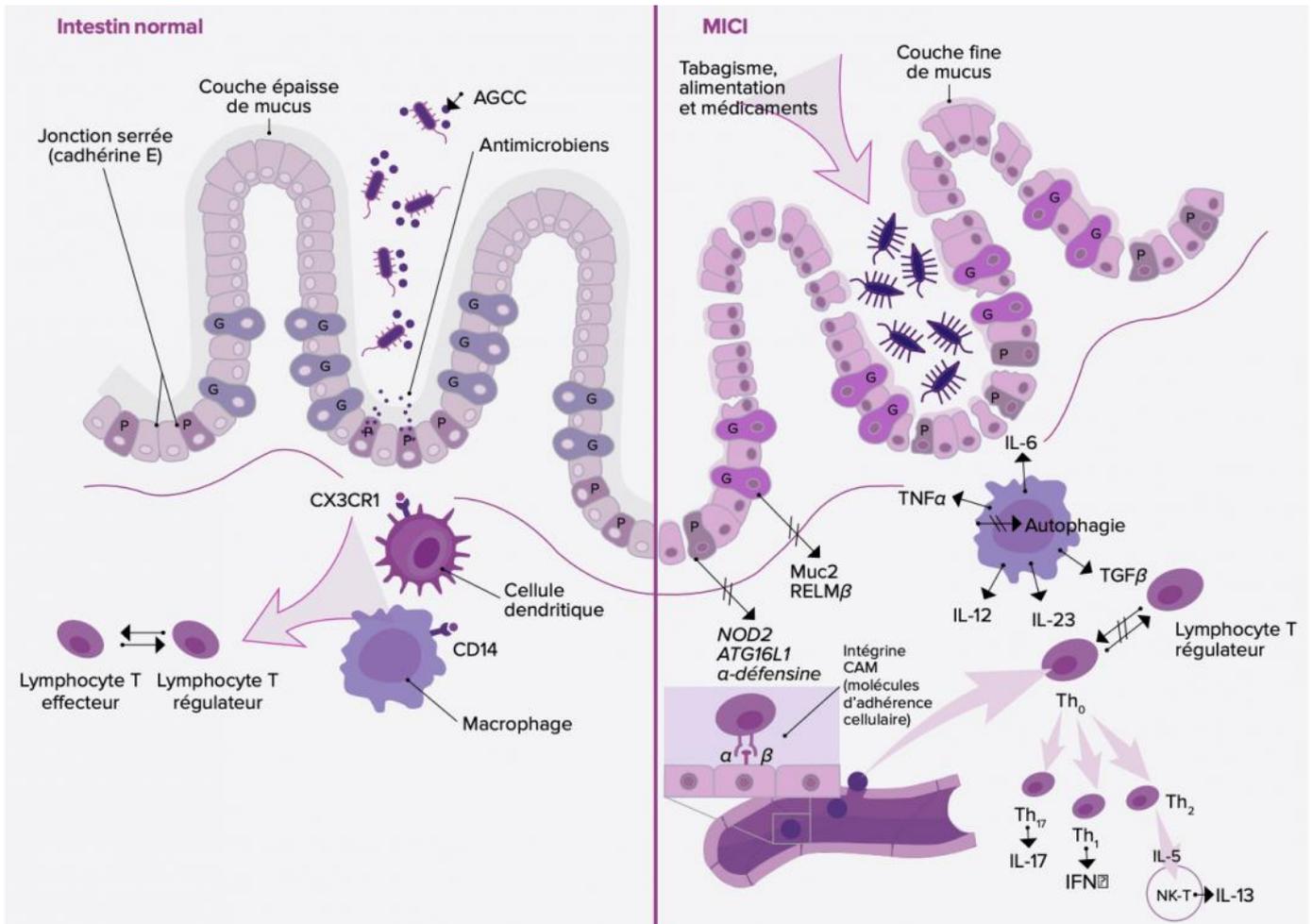


Figure 02 : Altérations de la muqueuse intestinale en cas de MICI (**Ramos et Papadakis, 2019**)

La MC se caractérise par une atteinte chronique inflammatoire du tube digestif (**Brown et al., 2005**). Les LT en particulier LTCD4+ auxiliaires (T helper «Th») produisent différents types de cytokines et jouent un rôle clé dans l’initiation et la perpétuation de l’inflammation et des lésions intestinales, la MC est liée à une réponse excessive des LTCD4+ de type Th1 qui produisent de grandes quantités d’interféron INF-γ sous le contrôle de l’interleukine-12 (IL-12), tandis que la RCH est plutôt associée à un profil de cytokines de type Th2 avec un excès de production d’Il-13. Une autre population de lymphocytes TCD4+ dits « Th17 » capable de produire différents cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, IL-17, IL-21 et IL-22 contribuent à l’inflammation digestive observée dans les deux formes de MICI mais en particulier au cours de MC (**Parronchi et al., 1997 ; Berrebi et al., 1998**).

I.5.2 Facteurs génétiques

Plusieurs gènes ont été identifiés comme jouant un rôle dans la susceptibilité aux MICI, en particulier ceux liés à l’immunité innée et adaptative, à l’homéostasie de la

muqueuse intestinale et à la réponse aux infections bactériennes. Parmi les variations génétiques les plus étudiées, on trouve les polymorphismes de nucléotide unique (SNP) dans les gènes *NOD2/CARD15*, *IL23R*, et *ATG16L1*. Le gène *NOD2/CARD15* est associé à une susceptibilité accrue à la maladie de Crohn, surtout chez les personnes d'origine européenne. Les mutations dans ce gène influencent la régulation de la réponse immunitaire aux bactéries intestinales, contribuant ainsi à l'inflammation chronique caractéristique de la maladie de Crohn (**Hugot et al., 2001**).

Le gène *IL23R*, codant pour une sous-unité du récepteur de l'IL-23, joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire et l'inflammation. Les variations génétiques dans ce gène peuvent altérer la signalisation de l'IL-23, augmentant ainsi la susceptibilité à la maladie de Crohn et à la colite ulcéreuse (**Duerr et al., 2006**). Le gène *ATG16L1* est impliqué dans l'autophagie, un processus de dégradation des protéines et organites cellulaires endommagés. Les variations génétiques dans ce gène ont été liées à une susceptibilité accrue à la maladie de Crohn, en perturbant l'autophagie et favorisant l'inflammation chronique observée dans cette maladie (**Rioux et al., 2007**). De plus, des études de séquençage ont identifié des mutations rares dans plusieurs gènes augmentant le risque de MICI, notamment les gènes de la famille *TNFSF15* (**McGovern et al., 2010**). Ces mutations représentent seulement une partie des nombreuses variations génétiques impliquées dans la susceptibilité aux MICI.

I.5.3 Microbiote intestinale

Le microbiote intestinal, constitué de milliards de micro-organismes tels que des bactéries, des virus et des champignons, joue un rôle crucial dans la digestion, l'absorption des nutriments, le métabolisme et l'immunité de l'hôte (**Belizário et Napolitano, 2015**). Les patients atteints de MICI présentent un microbiote intestinal altéré (dysbiose), caractérisé par une réduction de la diversité des espèces bactériennes et une augmentation des bactéries pathogènes et inflammatoires (**Gevers et al., 2014, Altwegg et Michon, 2020**). Cette dysbiose est liée à une inflammation chronique de l'intestin, une altération de la perméabilité intestinale et une diminution de la fonction barrière, permettant aux bactéries pathogènes de traverser la paroi intestinale et de déclencher une réponse inflammatoire (**Scaldaferri et al., 2013**).

I.5.4 Facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux, tels que le stress, la pollution de l'air, le tabagisme, les infections, le régime alimentaire et l'utilisation d'antibiotiques, ont été identifiés comme facteurs de risque pour les MICI (**Xavier et Podolsky, 2007**).

a) Stress

Le stress psychologique peut aggraver les symptômes des MICI et perturber l'équilibre de la flore intestinale. Des études ont montré que des techniques de gestion du stress, telles que la relaxation et la méditation, peuvent aider à améliorer les symptômes et à prévenir les rechutes (**Mawdsley et Rampton, 2005**).

b) Pollution de l'air

Les particules fines, les gaz d'échappement et autres polluants peuvent déclencher une inflammation de l'intestin et altérer la fonction immunitaire (**Khalili et al., 2012**).

c) Tabagisme

Le tabagisme est un facteur de risque bien établi pour la maladie de Crohn, mais il peut également avoir des effets complexes sur la colite ulcéreuse. Alors que le tabagisme protège contre la colite ulcéreuse en réduisant le besoin de colectomie après le début de la maladie, il augmente le risque de développer la maladie de Crohn et en aggrave l'évolution, nécessitant davantage de stéroïdes, d'immunosuppresseurs et de réopérations. L'arrêt du tabac peut aggraver la colite ulcéreuse tout en améliorant la maladie de Crohn, illustrant les effets différenciés du tabagisme sur ces deux maladies (**Cosnes, 2004**).

d) Infections

Les infections intestinales peuvent déclencher ou aggraver les symptômes des MICI. Les bactéries, les virus et les parasites peuvent provoquer une inflammation de l'intestin et perturber l'équilibre de la flore intestinale (**Sartor, 2008**).

e) Régime alimentaire

Des recherches ont montré que le régime alimentaire peut influencer la santé intestinale et jouer un rôle dans le développement des MICI. Par exemple, une alimentation riche en graisses saturées, en sucres et en produits transformés peut augmenter le risque de développer une MICI. À l'inverse, une alimentation riche en fruits, légumes, céréales complètes et acides gras oméga-3 peut réduire ce risque (**Ananthakrishnan et al., 2014**).

I.6 Traitement des MICI

I.6.1 Anti inflammatoire

a) Corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont supérieurs pour induire la rémission des colites ulcéreuses et des maladies de Crohn. Ils sont disponibles sous forme de comprimés oraux, de lavements ou de mousses rectales, et sous forme injectable. Cette dernière a considérablement réduit la mortalité associée (**Fasci-Spurio *et al.*, 2017**). Les corticostéroïdes contrôlent la réponse inflammatoire en inhibant les molécules d'adhésion, en induisant l'apoptose des lymphocytes activés et en réduisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Le budésônide, bien que moins efficace que les corticostéroïdes classiques pour induire une rémission, s'est révélé efficace pour traiter la maladie de Crohn. Il présente une faible biodisponibilité systémique, ce qui entraîne moins d'effets indésirables (**Gajendran *et al.*, 2017**).

b) Aminosalicylés

Également appelés mésalazine, les métabolites de l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) sont rapidement oxydés par le HOCl, un oxydant puissant généré lors de l'inflammation intestinale. Ces composés peuvent être prescrits comme traitement de première intention pour maintenir la rémission chez les personnes atteintes de rectocolite hémorragique et de maladie de Crohn légère à modérée (**Kang *et al.*, 2017 ; Ungaro *et al.*, 2017**). Disponibles sous forme de comprimés oraux, de lavements ou de suppositoires, ces médicaments incluent La sulfasalazine, la mésalamine orale, la mésalamine rectale, l'olsalazine et le balsalazide. Ils agissent en inhibant les enzymes cyclo-oxygénase (COX) et lipoxygénase (LOX) de la voie métabolique de l'acide arachidonique, réduisant ainsi la formation de prostaglandines et de leucotriènes pro-inflammatoires. Cependant, leur mécanisme d'action précis reste encore incertain (**Ungaro *et al.*, 2017 ; Gajendran *et al.*, 2017**).

I.6.2 Anticorps monoclonaux (anti-TNF- α)

Les anticorps monoclonaux inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF) comprennent l'infliximab, l'adalimumab et le certolizumab. Ces médicaments se révèlent très efficaces pour induire et maintenir la rémission. Des études ont montré que les anti-TNF- α sont efficaces pour la guérison des muqueuses, la réduction de l'activité clinique et l'amélioration des résultats à long terme chez les patients atteints de colite ulcéreuse modérée à sévère, faisant de ces traitements un pilier des protocoles actuels. L'infliximab, administré par perfusion intraveineuse, joue un rôle central dans le processus inflammatoire. En se liant

au TNF soluble, il empêche le déclenchement de la cascade inflammatoire, et en se liant au TNF membranaire, il induit l'apoptose (figure 03) (Picco et Cangemi, 2009 ; Samaan *et al*, 2014).

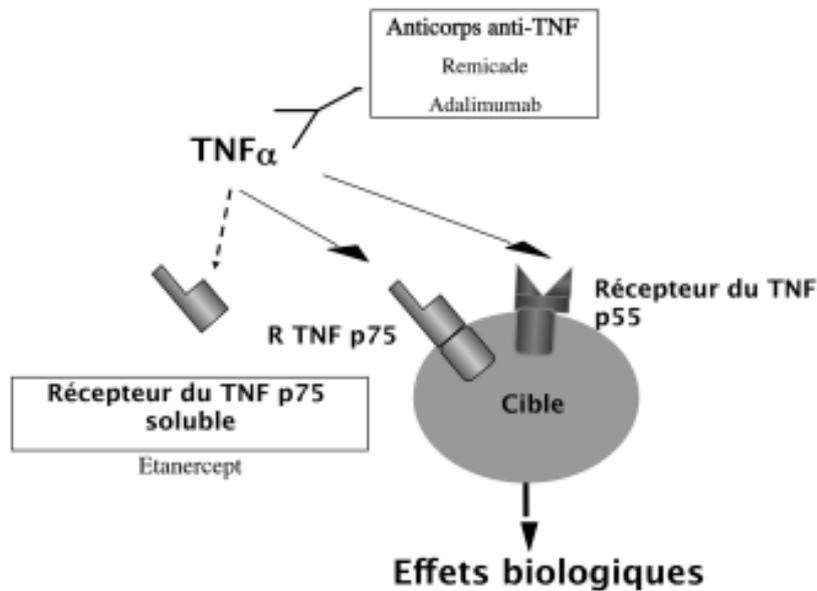


Figure 03 : Inhibition thérapeutique du TNF- α par les anticorps monoclonaux comme le remicade et l'adalimumab (Miossec, 2018).

I.6.3 Les immunomodulateurs

Le méthotrexate (MTX), un "analogue de l'acide folique", et les thiopurines sont couramment utilisés pour traiter la maladie de Crohn. L'azathioprine (AZA) et son métabolite, la 6-mercaptopurine (6-MP), sont des agents antimétabolites appartenant à la famille des thiopurines (analogues des purines). Après administration, l'AZA est convertie non enzymatiquement en 6-MP. Ce dernier suit ensuite trois voies enzymatiques compétitives. Lorsqu'il est métabolisé par l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT), il se transforme en thioinosine monophosphate (TIMP) puis en thioguanine monophosphate (TGMP), conduisant à la formation de métabolites actifs (TGNs) qui produisent l'effet immunosuppresseur thérapeutique en agissant comme antagoniste de la purine, interférant ainsi avec la synthèse de l'ADN et de l'ARN. En compétition avec la voie de l'HGPRT, les voies de la xanthine oxydase (XO) et de la thioguanine méthyltransférase (TPMT) détoxifient le 6-MP intracellulaire en acide 6-thiourique et 6-méthylmercaptopurine (6-MMP) respectivement (figure 04) (Guillot *et al*, 2017).

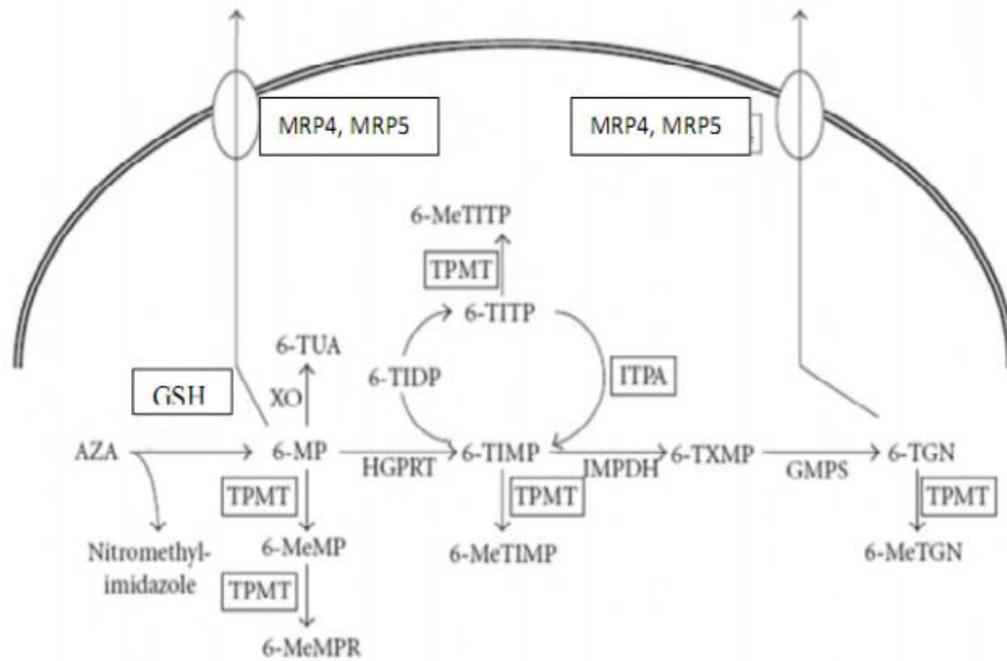


Figure 04 : Métabolisme et transport de l'azathioprine (Guillot et al, 2018).

I.6.4 Les antibiotiques

Les antibiotiques constituent un traitement complémentaire pour réduire la charge bactérienne intestinale (Sals-campos, 2014). Figurent parmi les médicaments les plus prescrits et constituent une des sources majeures de dépenses de santé liée aux médicaments (Carbon, 2000). Ce sont des molécules produites par des champignons, par des bactéries, ou par synthèse capables d'inhiber la réplication d'une bactérie (antibiotique bactériostatique) ou de la tuer (antibiotique bactéricide). Un antibiotique agit du fait de son affinité pour une cible vitale pour la bactérie parmi Les principales cibles des antibiotiques : la paroi bactérienne (bêtalactamines, glycopeptides), la synthèse de l'ADN (quinolones, nitro-imidazolés), la synthèse protéique (macrolides, aminosides, cyclines), l'inhibition compétitive (sulfaméthoxazole et triméthoprimine) (Gras et Choutet, 2010). Les antibiotiques tétracyclines ont été l'une des premières classes développées.

- **La ciprofloxacine** : Un antibiotique qui inhibe l'ADN gyrase bactérienne, une enzyme essentielle à la réplication de l'ADN bactérien (Solomon, 1993).
- **Le métronidazole** : Il exerce son action sur certains germes anaérobies présents dans la lumière intestinale en bloquant la synthèse des acides nucléiques (Lemann et al., 1993).
- **La doxycycline** : (α -6-désoxytétracycline) (Figure 05) est un dérivé semi-synthétique de l'oxytétracycline, elle a une activité contre un très large éventail de

bactéries Gram-positives, Gram-négatives et « atypiques » (Jacobs *et al*, 2004 ; Jones *et al*, 2004 ; Morrissey *et al.*, 2005). La doxycycline pénètre dans la cellule via les pores hydrophiles de la membrane cellulaire externe. Elle inhibe la synthèse des protéines bactériennes en se liant de manière réversible à la sous-unité ribosomale 30S et en empêchant l'association de l'aminocyl-ARNt avec le ribosome bactérien. Une inhibition supplémentaire de la synthèse des protéines se produit dans les mitochondries par liaison aux ribosomes 70S. C'est un antibiotique bactériostatique (Chopra et Roberts, 2001).

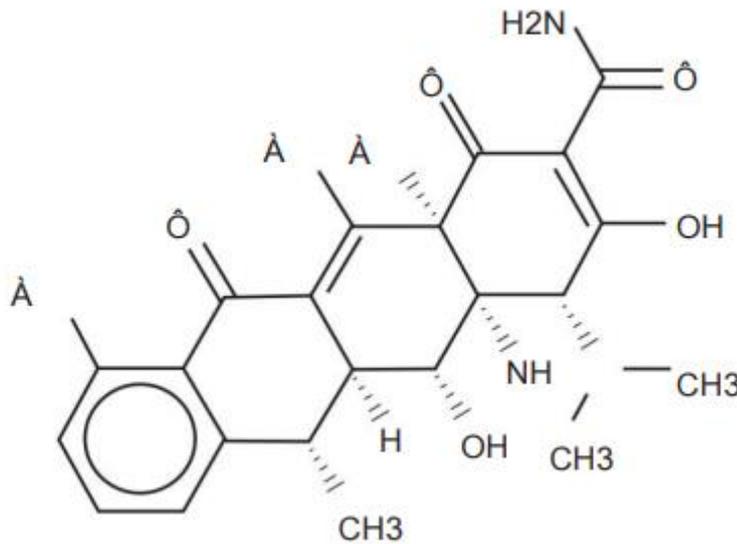


Figure 05 : Structure chimique de la doxycycline (Natasha et Patrick., 2009)

II. Généralités sur le lin

Le lin est une plante herbacée annuelle de la famille des Linaceae (Beroual *et al.*, 2013) du nom Latin *Linum usitatissimum*, signifie le lin de tous les usages (Muir et Westcott, 2003), elle est géographiquement très répandue (300 espèces environ) réparties en 15 genres. En anglais, appelé Flax, en arabe El katan.

Cette plante atteint une hauteur de 20 à 150 cm et possède une racine pivotante et des tiges très fibreuses. Ses branches se terminent par des fleurs bleu vif suivies de fleurs blanches, et ses feuilles sont lancéolées. Les fruits sphériques contiennent deux graines dans chacun des cinq compartiments (Figure 06). Les graines, aplaties et ovoïdes avec une base arrondie et un sommet pointu, mesurent de 3,3 à 5 mm de long et leur couleur varie du jaune au brun foncé. Le cycle de culture, du semis à la récolte, dure entre 90 et 150 jours (Muir et Westcott, 2003). Originaire du Moyen-Orient, de l'Asie de l'Ouest et de la Méditerranée (Iserin, 2001),

cette plante est cultivée pour ses fibres textiles ou pour la production d'huile. C'est une plante millénaire aux vertus médicinales, la composition des graines de lin englobe de nombreux éléments biologiquement actifs, y compris l'acide linoléique, l'acide linoléique, les lignanes, les peptides cycliques, les polysaccharides, les alcaloïdes, les glycosides cyanogéniques et le cadmium (**Shim et al., 2014 ; Ganorkar et Jain, 2013**). Il a été apporté que la plante exerce un effet laxatif et anti-inflammatoire (**Halligudi, 2012 ; Machado et al., 2015**) Un effet anti oxydant et anticancéreux, un effet antithrombotique, et anti-allergénique (**Bekhit et al., 2017**). Les graines de lin favorisent la santé cardiovasculaire et stimule l'immunité (**Halligudi, 2012**) ainsi utilisée pour de nombreuses affections liées au tractus gastro-intestinal (GI), y compris la constipation, les dommages au côlon dus à l'abus de laxatifs, la diarrhée, l'inflammation de la muqueuse intestinale (diverticulite), le côlon irritable, plaies dans la muqueuse du gros intestin (colite ulcéreuse), et inflammation de l'intestin grêle (entérite), et la régression de la croissance des cancers du côlon (**Maillard et al., 2002; Shim et al., 2014**). Les graines de lin prodiguent un effet calmant et anti inflammatoire réduisant l'irritation du colon dans les infections comme les colites, l'inflammation intestinale et les hémorroïdes (**Chen et al., 2012**).



Figure 06 : Photographie de la plante de lin (**Zhang et al., 2018**)

Tableau II : Composition de 100g des graines de *Linum usitatissimum* (Coskuner et Karababa, 2007)

Constituant		Composition pour 100g
Energie		534 kcals
Eau (g)		6,96
Protéines (g)		18,3
Fibres (g)		27, 3
Lipides (g)		42,15
	Omega 3(Acide α -linoléique)	22 ,8
	Omega 6 (Acide linoléique)	5,9
	Omega 9(Acide oléique)	7,55
	Gras saturé	3,65
Minéraux (mg)		
	Calcium	255
	Fer	5,73
	Magnésium	392
	Potassium	813
	Phosphore	642
Vitamines (mg)		
	B1	1,64
	B3	3,08
	B5	0,98

III. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances bioactives provenant de différents types d'organismes vivants, notamment les plantes, les animaux, les champignons et les bactéries (Moreira *et al.*, 2018). Ils possèdent un atome d'azote qui a la capacité d'accepter des protons et un ou plusieurs atomes d'hydrogène amine qui a la capacité de donner des protons. Ces atomes établissent des liaisons hydrogène avec des protéines, des enzymes et des récepteurs. De manière générale, les alcaloïdes présentent des groupes fonctionnels tels que l'hydroxyle phénolique, qui pourrait expliquer leur exceptionnelle bio-activité (Cushnie *et al.*, 2014). Leurs propriétés sont généralement variées et dépendent de leur compositions chimiques (Harborne JB, 1998). Ces substances, peuvent avoir une action sur le système nerveux

central comme antidépresseur (scopolamine, morphine) ou stimulants (caféine) le système nerveux autonome (hordéine, éphédrine, atropine, ésérine). Elles peuvent aussi jouer le rôle d'antibiotiques comme la cyclosérine, la mytomycine, d'antitumoraux (vinblastine) et d'anesthésiques locaux (cocaïne) (**Badiaga, 2011**). Les alcaloïdes peuvent être classés en fonction de leur squelette carboné, tels que les alcaloïdes indole, isoquinoline et pyridine. De plus, leur classification peut également se baser sur leurs précurseurs biochimiques, comme l'ornithine, la lysine, la tyrosine et le tryptophane (**Cushnie et al., 2014**).

III.1 Classification des alcaloïdes

La classification la plus précise et la plus couramment utilisée des alcaloïdes se base sur leur structure principale, Selon la dernière nomenclature, les alcaloïdes sont répartis en grands groupes (Figure 07), comprenant : pyrrolidine, pyridine, quinoléine, isoquinoléine, indole, quinazoline, stéroïdiens, diterpénoïdes et autres alcaloïdes. Chacun de ces groupes est ensuite divisé en plusieurs sous-groupes, en fonction des caractéristiques structurales spécifiques de leurs représentants (**Ahmed Shakil., 1998**).

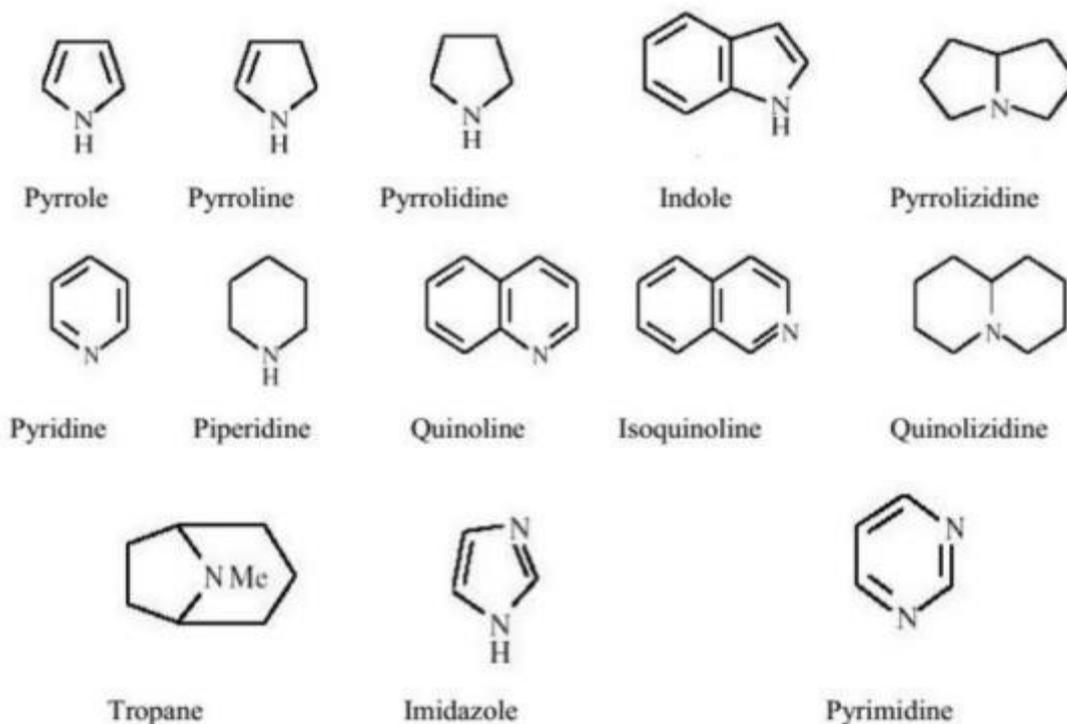


Figure 07 : Structure hétérocyclique du squelette constituant le groupe des alcaloïdes (**Bribi, 2018**).

III.2 Propriétés physico-chimiques

Les alcaloïdes possèdent un caractère basique, dont la basicité dépend du doublet électronique de l'azote (**Robinson, 2000**). À température ambiante, les alcaloïdes non oxygénés sont liquides, volatils et peuvent être entraînés par la vapeur d'eau. En revanche, les alcaloïdes oxygénés sont solides et cristallisables (sous forme de sels), généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués, mais insolubles dans les solvants organiques apolaires (**Bruneton, 2009**).

III.3 Propriétés pharmacologiques

Les alcaloïdes sont des composés du métabolisme secondaire dans les plantes agissent à faibles doses et peuvent présenter une forte toxicité même si a des doses très faibles (**Khan et al., 2017 ; Fan et al, 2012**). De nombreux alcaloïdes ont des effets précliniques marqués, notamment des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antibactériennes, anti-plaquettaires, et anti-oxydantes (**Khan, 2007 ; Khan et al, 2017**). Analgésique (cocaine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (reserpine), antitussive (codeine), dépressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaine), narcotique (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (ephedrine) (**Hesse, 2002.**). Ils ont une action sur le système nerveux central et le système nerveux autonome par leurs capacités à traverser la barrière hémato-méningée et à interagir avec les récepteurs de neurotransmetteurs, et affecter les transmetteurs chimiques tels l'acétyl-choline, la dopamine, la sérotonine et l'acide-aminobutyrique (GABA) (**Larkins et Wynn, 2004 ; Robinson, 2000**).

Partie pratique

CHAPITRE II

Matériel

et

Méthodes

II. Matériel et Méthodes

Le principal objectif de cette étude est de tester l'effet anti-inflammatoire de l'association des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* et l'antibiotique « Doxycycline » sur l'inflammation sub-chronique, cette étude a été effectuée au sein du laboratoire de la FSNV de l'université de Bejaia.

II.1. Matériel

II.1.1 Matériel végétale

Cette étude a été réalisée sur les graines de *Linum usitatissimum* (figure 08) achetée chez un herboriste et identifiée au niveau du laboratoire de BVEB de l'université de Bejaia.

- **Règne** : Plante
- **Division** : Magnoliophyta (Angiospermes)
- **Classe** : Magnoliopsida (Dicotylidones)
- **Sous-classe** : Rosidae
- **Ordre** : Linales
- **Famille** : Linaceae
- **Genre** : *Linum*
- **Espèce** : *Linum usitatissimum*



Figure 08 : Graines de lin (Photo originale, animalerie FSNV, université de Bejaia).

II.1.2 Animaux

Cette étude a été réalisée sur des souris males BALB/c, fournies par l'institut Pasteur d'Alger ont un poids $24g \pm 2g$. Les souris ont été gardées au niveau de l'animalerie de l'université de Bejaia à une température ambiante ($25 \pm 2C^\circ$) avec un cycle lumière /obscurité de 12 h et avec accès libres à l'eau et à l'aliment. Les souris ont été pesées, marquées et partagées en cinq groupes de huit souris chacun.



Figure 09 : Photographie des souris BALB/c (Photo original, animalerie FSNV, université de Bejaia).

II.1.3 Réactifs

Les appareils et les réactifs utilisés dans cette étude sont représentés dans l'annexe.

II.2 Méthodes

II.2.1 Extraction des alcaloïdes totaux de *Linum usitatissimum*

Les graines de *Linum usitatissimum* ont été lavées et débarrassés de résidus, puis broyées grâce à un broyeur électrique et enfin tamisées pour avoir une poudre homogène. Afin d'effectuer l'extraction des alcaloïdes des graines de *Linum usitatissimum*, nous avons suivi le protocole de soušek *et al.*, 1999 qui s'agit d'une extraction solide-liquide.

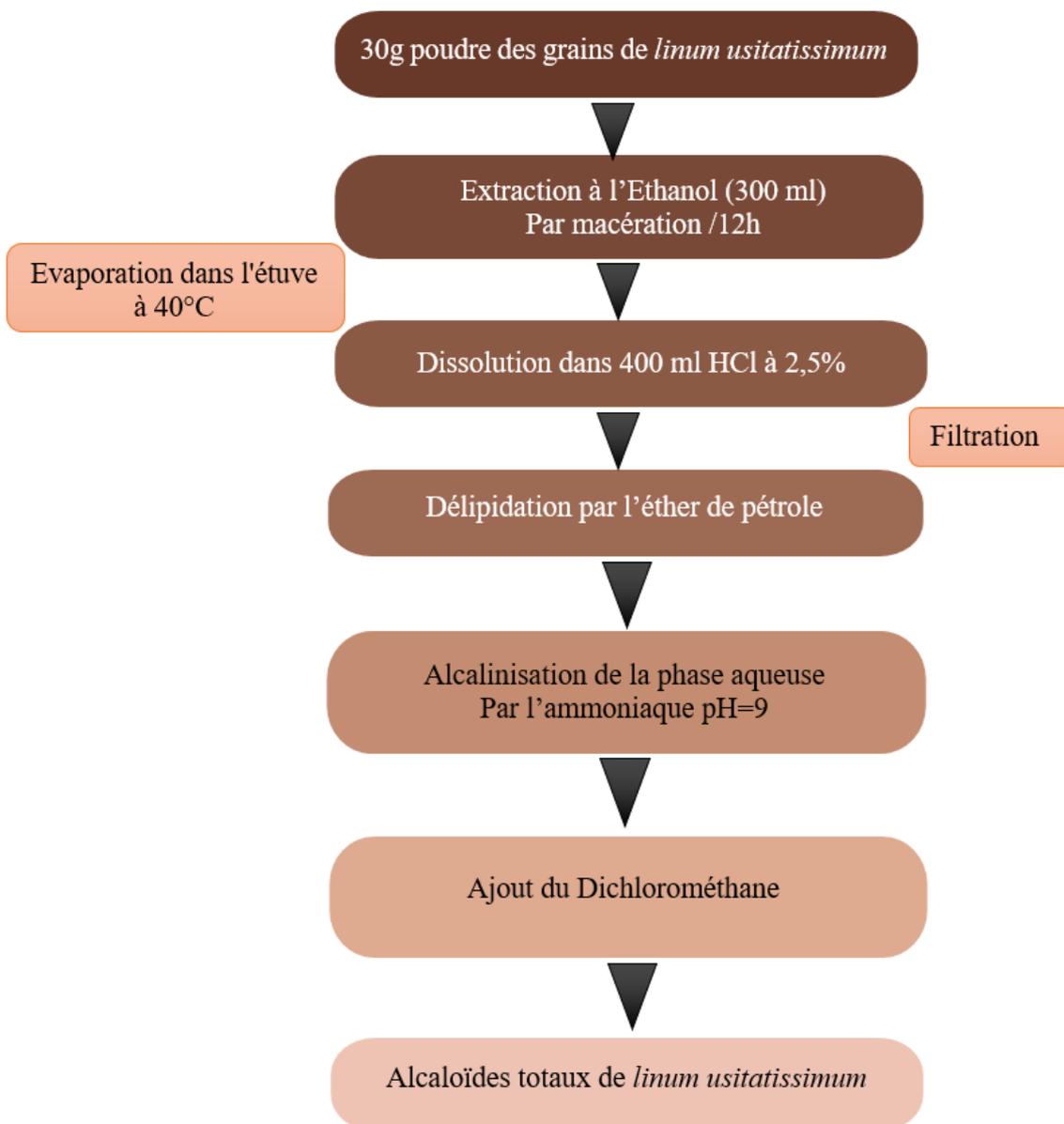


Figure 10 : Protocole d'extraction des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (Soušek *et al.*, 1999).

On a calculé le rendement des alcaloïdes selon la formule suivante :

$$R = P_{EX}/P_{MS} \times 100$$

- P_{EX} =Poids de l'Extrait sec.
- P_{MS} =Poids de la Matière sèche.

II.2.2 Etude de l'activité anti-inflammatoire intestinale

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'effet anti-inflammatoire intestinal de l'association d'alcaloïdes de *Linum usitatissimum* et la doxycycline (ALU/ATB) sur des souris atteintes l'inflammation sub-chronique induite par l'acide 2,4-Dinitrobenzène Sulfonique (DNBS) selon protocole de Martín et al., 2014 (Figure 13).

Au cours de cette étude, les souris ont été partagées en cinq groupes homogènes en fonction de leurs poids de huit souris pour chaque lots, contrôle non malade, contrôle malade, ALU(50 mg /kg), ATB (25 mg/kg) et l'association des ALU et ATB (50 mg+25 mg/kg) puit ont été privées de nourriture a fin d'administrer une solution de DNBS (200 mg/kg) préparée dans un volume de 50µl d'eau distillé par voie rectale après les avoir anesthésiées en position tête vers le bas pendant 1 minutes afin d'éviter la sortie de la solution de DNBS (Figure 11).



Figure 11 : Administration du DNBS par voie rectale chez des souris BALB/c (photo, original animalerie FSNV, université de Bejaïa)

Les souris ont été surveillées immédiatement après la première administration de DNBS durant trois jours afin de détecter tout changement comportemental tels que la mortalité, perte de poids, selles saignantes et diarrhées.

Quatre jours après la période DNBS (période de récupération), les ALU (50 mg /kg), l'ATB (25 mg/kg) et l'association des ALU et ATB (50 mg + 25 mg/kg) ont été administrés par voie intragastrique pendant 7 jours, respectivement (période de gavage) (figure 12). 12 jours après la 1^{ère} administration de DNBS, nous avons procédé à la réactivation de l'inflammation intestinale sub-chronique par une deuxième administration DNBS (100 mg/kg).

Trois jours après cette réactivation les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale sous anesthésie.



Figure 12 : Administration des alcaloïdes de *Linum usitatissimum*, la doxycycline et le mélange des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* et la doxycycline par voie orale (photo original, animalerie FSNV, université de Bejaïa).

Le poids corporel, la consistance des selles, les saignements, la consommation de la nourriture et de l'eau ont été surveillés et notés tout au long de la période du protocole expérimentale. Les souris ont été anesthésiées pour faciliter les sacrifices par dislocation cervicale, puis disséquées pour enlever les côlons, et les nettoyer de la graisse et de mésentère. Le côlon a été ouvert longitudinalement le long de la ligne mésentérique, le poids du côlon de chaque souris du groupe respectif a été pesé et sa longueur mesurée afin de calculer le rapport P/L (poids en g / longueur en cm), le colon a été couper on deux parties une pour l'étude histologique et l'autre pour effectuer les analyses biochimiques.

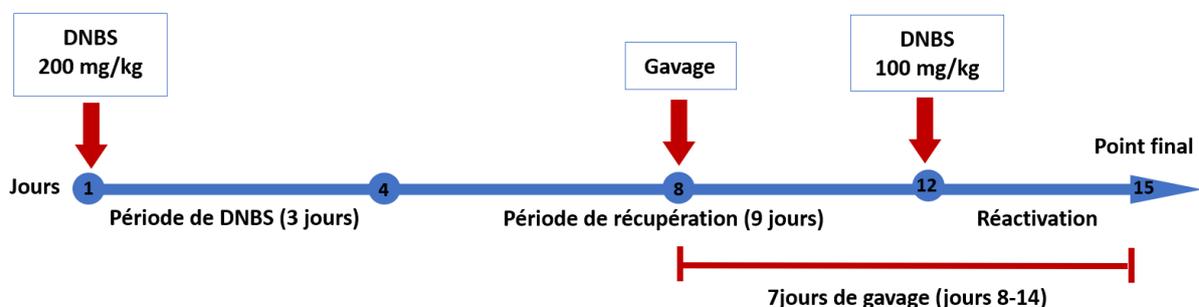


Figure 13 : Protocole expérimentale pour l'induction de l'inflammation sub-chronique chez la souris (Martín et al., 2014).

II.2.3. Etude histologique

L'objectif de l'étude histologique est de caractériser les aspects tissulaires et cellulaires de divers échantillons en créant des coupes extrêmement fines d'organes ou de tissus. Dans cette étude, des sections de 1 cm ont été prélevées du côlon (partie distale), puis cette portion a été soigneusement nettoyée avant d'être conservée dans une solution de formol à 10%.

La préparation des lames histologiques a été réalisée comme suit :

1) Macroscopie

Dans la phase de macroscopie, les échantillons déjà fixés dans une solution de formol à 10%, sont placés dans des histocassettes identifiées avec un marquage comprenant le lot et le numéro de souris.

2) Déshydratation et inclusion

La déshydratation consiste à éliminer le liquide cellulaire par un phénomène osmotique et il sera remplacée par de la paraffine. Pour cela, les échantillons placés dans des histocassettes sont insérés dans le portoir de l'automate, qui comprend douze baignoires effectuant les étapes suivantes :

- Huit baignoires contenant d'éthanol de concentrations croissantes de 70 à 100% pendant 45min chacun.
- Deux baignoires de xylène pour l'éclaircissement (clarification) pendant 30min chacun.
- Deux baignoires de paraffine fondue pour l'imprégnation pendant 1 h 30min chacun.

3) Enrobage

Cette étape implique l'enrobage des échantillons déshydratés avec de la paraffine (blocs de paraffine), en utilisant une station d'enrobage réglée à une température de 70°C et des moules en inox.

4) Réfrigération

En utilisant une plaque réfrigérante à -20°C pour démouler les blocs de paraffine des moules.

5) Microtomie

Elle comporte deux étapes :

a) Le dégrossissement : Le microtome est ajusté à 20µm pour débarrasser l'excès de paraffine jusqu'à l'arriver à l'échantillon.

b) Les coupes : Cette étape a pour but de réaliser des coupes minces de l'ordre de micron (3µm) à l'aide d'un microtome, qui sont ensuite étalées sur des lames numérotées.

Ensuite, les rubans contenant les échantillons sont immergés dans un bain d'eau chaude.

6) Déparaffinage

Les lames préparées ont été placées verticalement dans un portoire, puis elles ont été mises dans l'étuve à 80°C pendant 24h afin d'éliminer la paraffine.

7) La coloration

Elle consiste à visualiser les composants cellulaires tels que les noyaux et les membranes plasmiques à travers un processus impliquant plusieurs étapes par l'utilisation d'un protocole de routine (HE) qui colore les structures basophiles (les noyaux) en violet et les structures acidophiles (les cytoplasmes) en rose.

Etape d'éclaircissement

Elle consiste à mettre les lames dans un bain de xylènes mis sur une plaque chauffante, pendant 30 min au plus.

Etape de déshydratation

Consiste à mettre les lames dans un bain d'éthanol pendant 10 min

Etape d'hydratation

Consiste à mettre les lames dans de l'eau pendant 10 min

La coloration nucléaire

A l'aide d'un bain d'hématoxyline pendant 3 min suivi par un rinçage à l'eau.

Coloration cytoplasmique

A l'aide d'un bain d'éosine à 2% pendant 3 min puis rinçage à l'eau

8) Le montage des lames

Après la coloration, les lames ont été immergées dans deux bains d'éthanol de concentrations croissantes, puis dans deux bains de xylène pour éliminer toutes les impuretés.

Ensuite, les échantillons ont été fixés avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre (l'eukitt) et protégés avec des lamelles. Après le séchage, les lames ont été observées au microscope optique avec des grossissements de x4 et x10.

La figure n° 14 représente les différentes étapes de préparation des coupes histologiques.

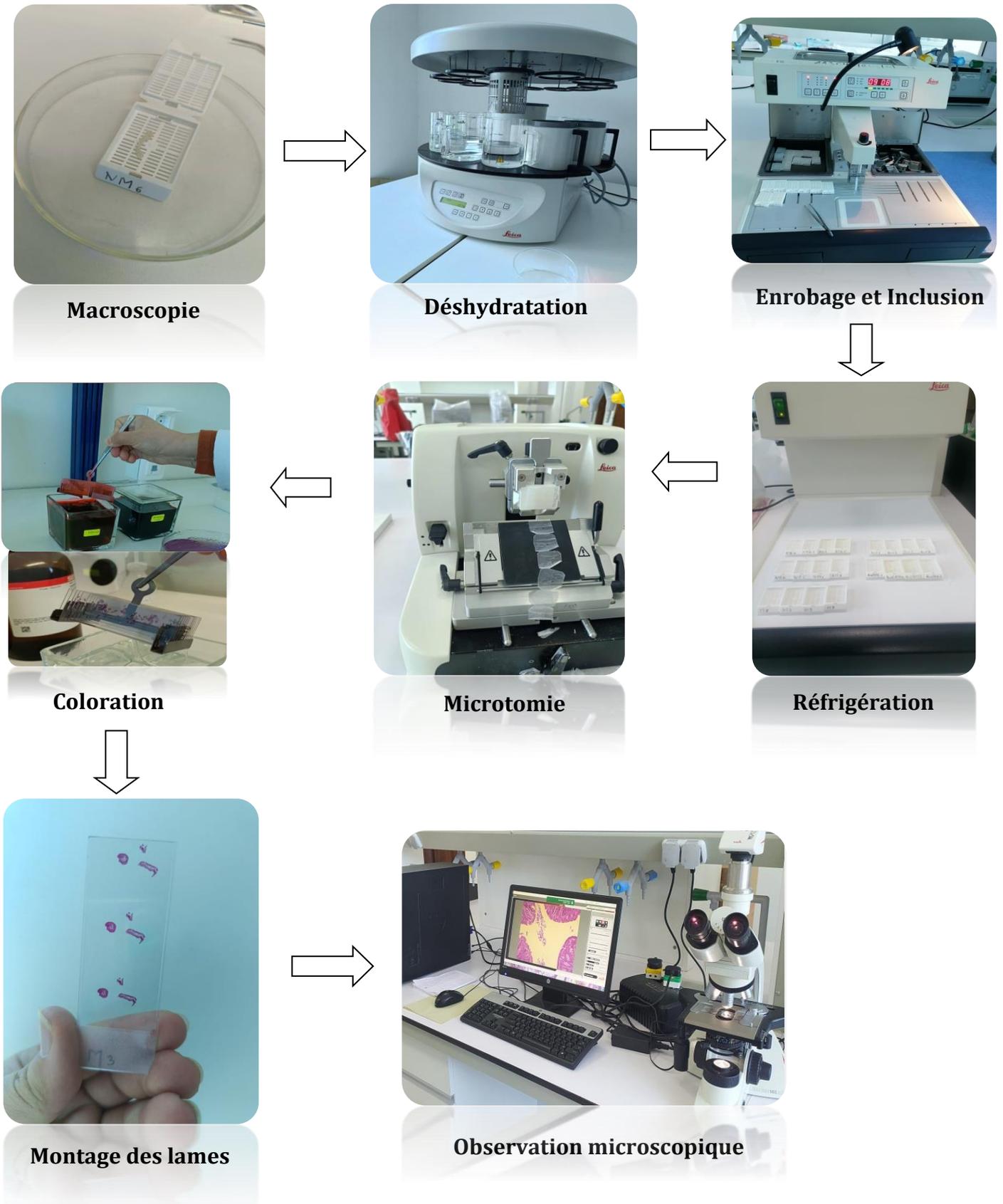


Figure 14 : Différentes étapes de préparation des coupes histologiques (Photo original, prise au niveau du laboratoire d'histologie de la faculté de médecine).

II.2.4. Etude biochimique

La partie du colon préparée pour les analyses biochimiques a été pesée et immergée dans un volume de la solution tampon (pH 6 /HTAB). Après la décongélation des côlons, on a passé à l'homogénéisation à l'aide d'un homogénéisateur électrique suivit par une sonication pour obtenir un homogénat puis une centrifugation de 700 tpm pendant 10 min à 4°C pour séparer les débris nucléaires et une deuxième centrifugation à 9000 tpm pendant 20 min pour isoler les surnageant post mitochondriales (PMS).

II.2.3.1. Monoxyde d'azote

Durant cette expérience, 100 µl de surnageant de côlon a été préparé avec l'ajout de TCA à 10%. Après une incubation à 4 °C pendant une heure, le tube a été centrifugé à 1466g Pendant 10 min. Le surnageant a été récupéré et mélangé avec 50 µl de Griess B et 50 µl de Griess A et 800 µl PBS.

Une incubation supplémentaire de 20 min a été réalisée, suivie d'une lecture au Spectrophotomètre à une longueur d'onde 543 nm (**Sun et al., 2003**).

II.2.3.2. Myélopéroxydase

Un mélange a été préparé dans un eppendorf contenant 100µl de surnageant et de 2.9 ml de tampon (pH 6) contenant 0.167 mg/ml d'O-dianisidine et 0.0005% de H₂O₂. Une fois le mélange préparé, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 460 nm pendant 3 min (**Renlund et al., 1980**).

II.2.3.3. Dosage des protéines

Un mélange de 10 µl de surnageant, de 90 µl d'eau distillée et de 4 ml de la solution Bleu brillant de Comassie a été agité à l'aide d'un vortex. L'absorbance final a été mesurée à une longueur d'onde de 595 nm.

II-5. Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au test ANOVA, test *Dunnnett's*, utilisé afin de comparer les valeurs des groupes traités aux valeurs du groupe malade. Les résultats de l'ensemble des tests effectués sont exprimés en moyenne ± SEM. Les différences ont été considérer comme significatives à * p< 0.05, hautement significatives à **p<0.01, et très hautement significatives à ***p<0.001.

CHAPITRE III

Résultats

et

Discussion

III.1 Résultats et discussion

III.1 Résultats

III.1.1 Taux d'extraction des alcaloïdes totaux de *Linum usitatissimum*

La teneur en alcaloïdes totaux de *Linum usitatissimum* est de 1.35%, déterminée en fonction des graines de lin broyées. Ces alcaloïdes ont été détectés grâce à des tests phytochimiques qui impliquent généralement l'utilisation de réactifs chimiques spécifiques, tel que le test au Dragendorff peut être utilisé pour détecter les alcaloïdes, où la formation d'un précipité orange-brun qui indique la présence de ces composés.

III.1.2 Activité antiinflammatoire intestinale

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet anti-inflammatoire intestinal des ALU, ATB et l'association des ALU/ATB contre l'inflammation sub-chronique induite par le DNBS chez des souris BALB/c.

Les résultats de cette étude ont révélés que l'administration du DNBS chez les souris du lot malade a provoqué une augmentation importante du l'indice d'activité de la maladie (DAI), avec des signes cliniques typiques, notamment : la diarrhée sanglante, diminution de la consommation de l'eau et de la nourriture, perte du poids corporel et une augmentation significative du rapport P/L, aussi des lésions macroscopiques ont été observés, par apport au lot témoin mais aucune mortalité n'a été rapportée.

III.1.2.1 Consommation d'aliment

Le DNBS a été administré J=0, la consommation de l'aliment des souris du lot control non malade a resté stable toute au long de l'expérience, par contre les trois lots traités par les ALU, l'ATB, l'association ALU/ATB et le lot DNBS a indiqué une différence significative ($p < 0.05$) par rapport au lot control non malade.

Après le traitement, la consommation de l'aliment des souris augmente progressivement contrairement aux souris de lot DNBS qui a resté constante. La réactivation de l'inflammation a révélé aux mêmes résultats que la première (Figure 15).

Pendant l'expérience ; une augmentation de la consommation de l'aliment a été observée, cela signifie que les ALU, l'ATB et l'association ALU/ATB n'ont pas provoqué une perte d'appétit.

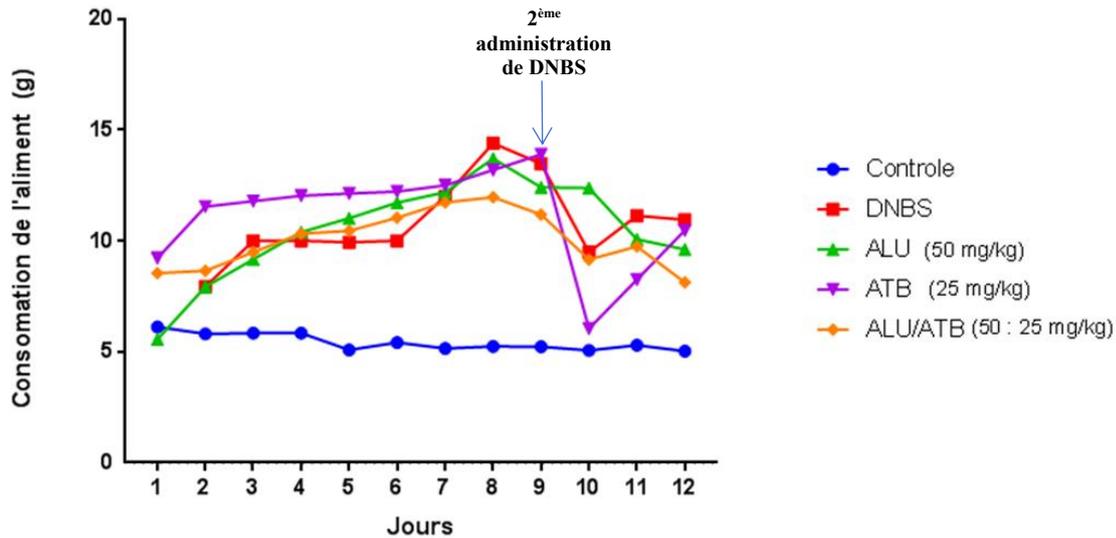


Figure 15 : Effets des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes de *Linum usitatissimum* /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur l'évolution de la consommation de la nourriture par souri.

III.1.2.2 Consommation d'eau

La consommation de l'eau chez les souris du lot contrôle non malade a resté stable toute au long de l'expérience, par contre les trois lots traités par ALU, ATB, l'association ALU/ATB et le lot DNBS. Cette consommation a été augmenté progressivement après la première administration du DNBS. Après 24h de la deuxième administration du DNBS, une diminution de la consommation de l'eau chez les trois lots traités par les ALU, ATB, l'association ALU/ATB et le lot malade a été observé, suivi par une augmentation pour le reste de l'expérience (Figure 16).

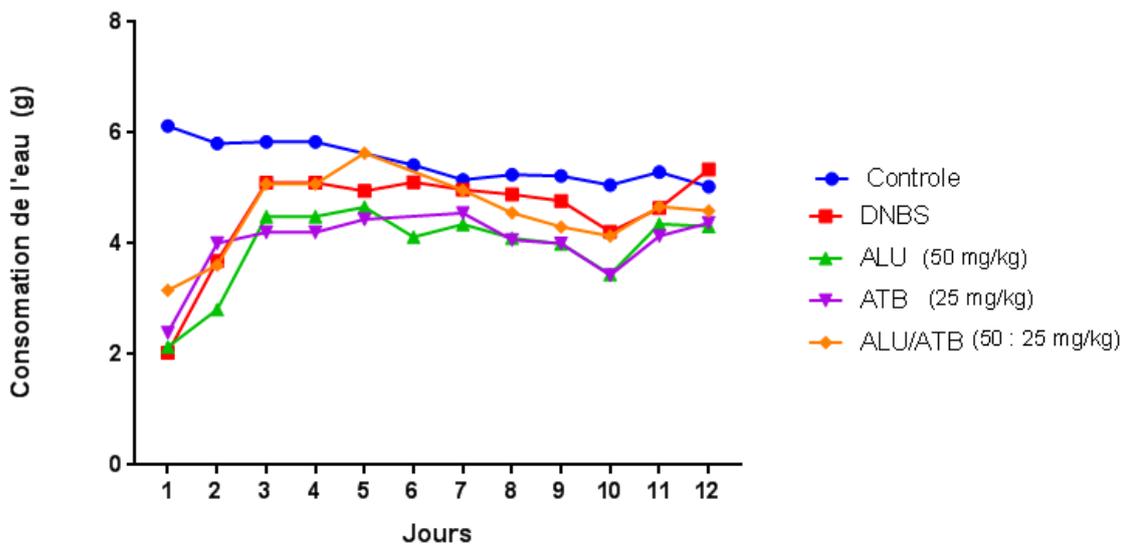


Figure 16 : Effets des Alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange Alcaloïdes *Linum usitatissimum* /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur l'évolution de la consommation de l'eau par souri.

III.1.2.3 Indice de l'activité de la maladie

L'administration du DNBS a augmenté le DAI d'une manière très hautement significatives ($p < 0.001$) par rapport au contrôle non malade. Le traitement des souris malades avec les ALU (50 mg /kg), ATB (25 mg/kg) et l'association ALU/ATB (50 : 25 mg/kg) a montré une réduction très significative de DAI ($p < 0.01$) par rapport au control non traité (Figure 17).

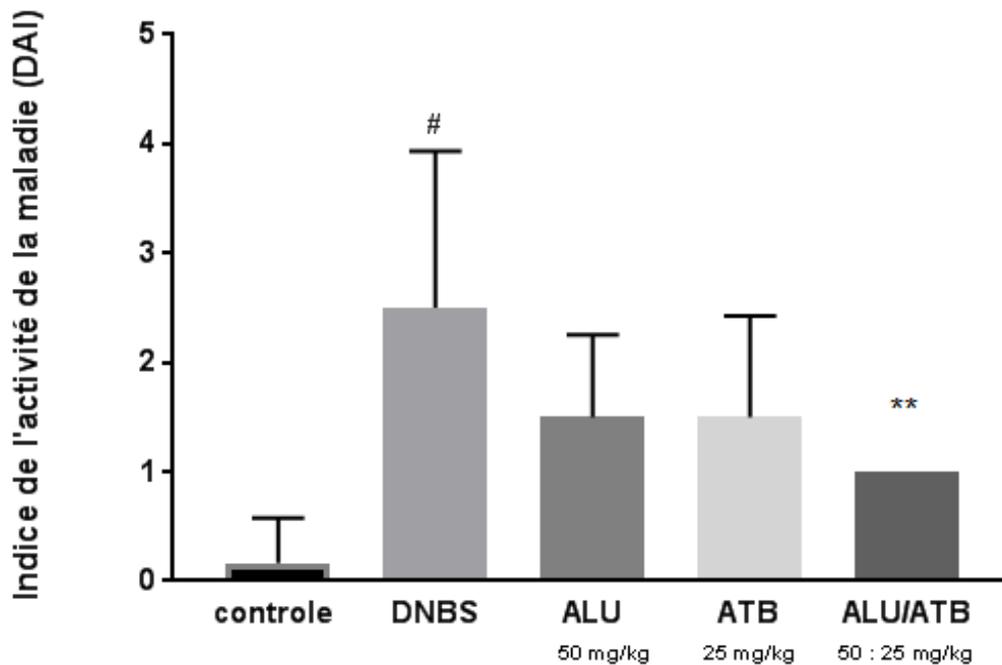


Figure 17 : Effets des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes *Linum usitatissimum* /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur le DAI dans un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS chez les souris.

III.1.2.4 Etat macroscopique des colons

Au niveau macroscopique, une diminution de la longueur des colons chez les souris du contrôle malade a été remarqué par rapport au contrôle non malade. Tandis que le traitement des souris avec l'association des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* avec la doxycycline a provoqué une amélioration de la longueur et une diminution du poids des côlons mieux que le groupe ALU et le groupe ATB, mais semblable au contrôle non malade indiquant ainsi une amélioration générale de l'état clinique des souris traitées (Figure 18 et 19).

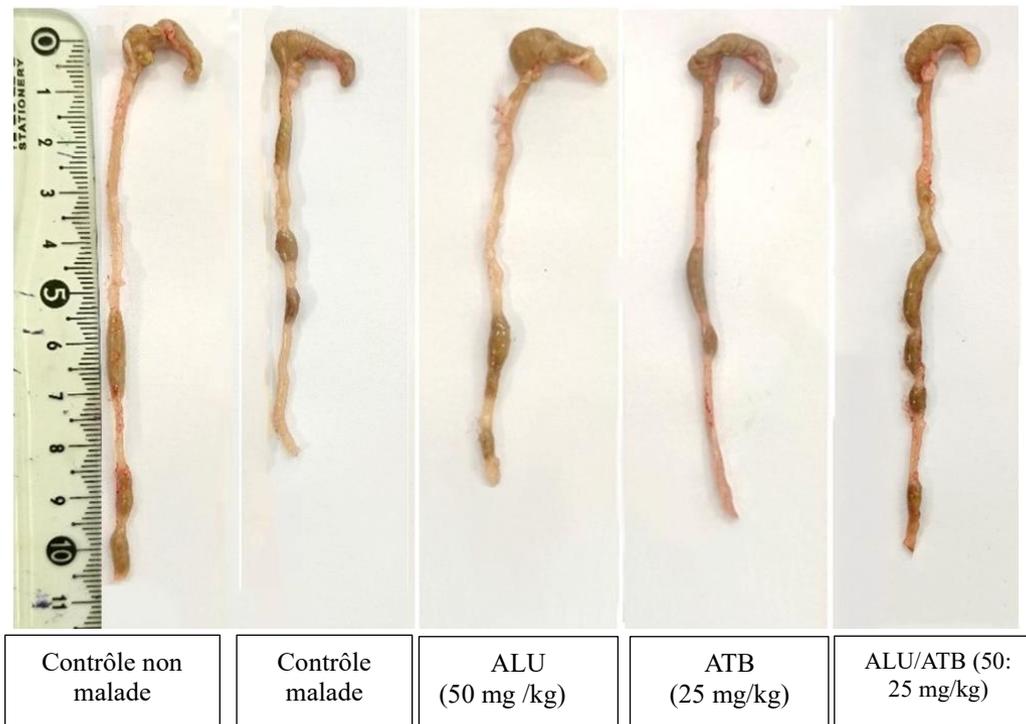


Figure 18 : Morphologie générale des côlons contrôle non malade, contrôle malade, alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes *Linum usitatissimum* /doxycycline (50 : 25mg/kg) après l'induction de l'inflammation sub chronique par le DNBS (photo originale).

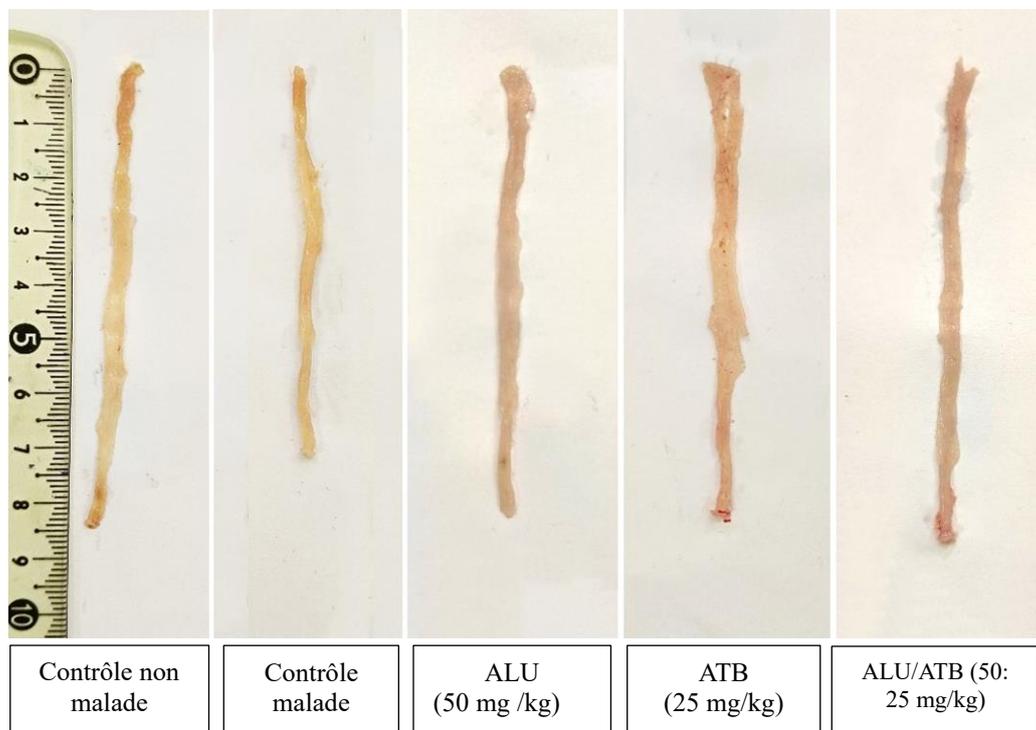


Figure 19 : Aspect macroscopique des côlons ouverts des groupes contrôle non malade, contrôle malade, alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes *Linum usitatissimum* /doxycycline (50 : 25 mg/kg) après l'induction de l'inflammation sub chronique par le DNBS (photo originale, animalerie FSNV, université de Bejaïa).

Le rapport poids/longueur (P/L) de colon est considéré comme un indicateur direct de la gravité et l'étendue de l'inflammation intestinale (Sotnikova *et al.*, 2013). Comme le montre la figure 20, l'administration des ALU, la doxycycline (ATB) et l'association ALU/ATB ont réduit d'une manière très significative ($p < 0.01$) les valeurs de ce dernier, à des niveaux plus ou moins similaires à ceux des souris dans le groupe non malade.

Il est évident que le contrôle malade avait un plus grand rapport moyen P/L du côlon (34.97 ± 5.08) comparé au contrôle non malade (25.25 ± 4.03), bien que ALU (50 mg /kg), ATB (25 mg/kg) et le l'association ALU/ATB (50 : 25 mg/kg) ont un rapport P/L plus faible (26.07 ± 3.13 , 24.92 ± 2.76 et 26.82 ± 2.55) respectivement par rapport au contrôle malade et la différence est très significative ($p < 0.01$) indiquant une possibilité de diminution du processus inflammatoire.

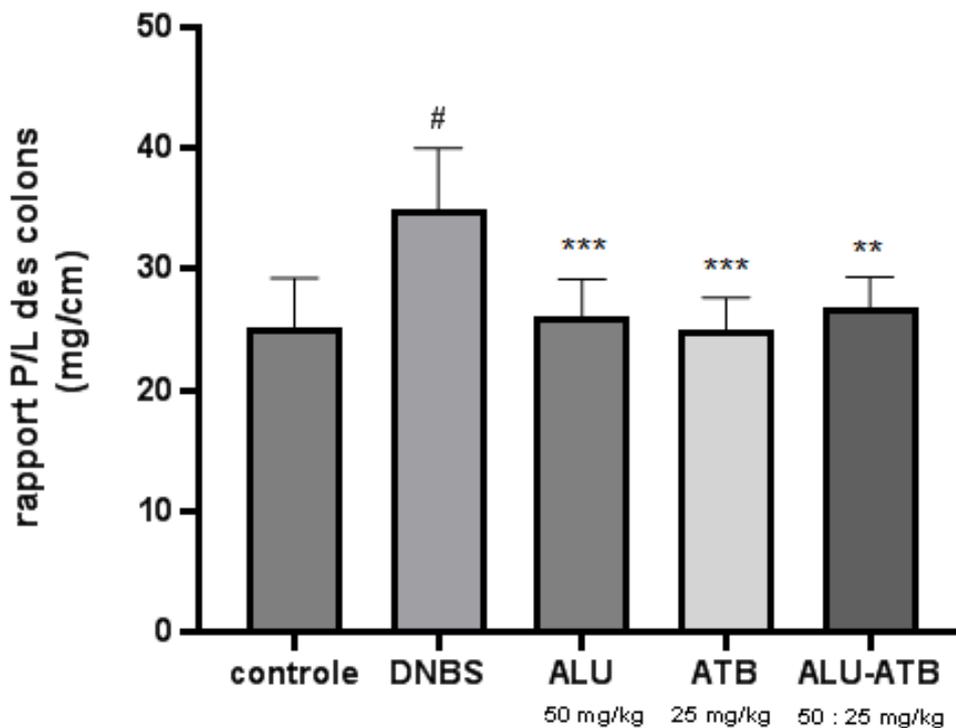


Figure 20 : Effets des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes *Linum usitatissimum* /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur le rapport P/L dans un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS chez les souris.

III.1.3 Résultat de l'analyse histologique

L'activité anti-inflammatoire intestinale des ALU (50 mg /kg), ATB (25 mg/kg) et l'association ALU/ATB (50mg/25mg/kg) a été confirmée après l'évaluation histologique des échantillons de la partie distale du colon, car le traitement a favorisé la régénération des tissus de l'épithélium intestinale. Ceci a été mis en évidence par une réduction significative des scores microscopiques par rapport au contrôle malade (DNBS) avec les trois lots traités.

Nous avons constaté une destruction des cellules épithéliales chez les souris enflammées ce qui entraîne la dégénérescence des cryptes intestinales et l'anarchie du tissu épithélial (Figure 18).

Tandis que l'administration des ALU (50 mg /kg) et l'association ALU/ATB (50mg/25mg/kg) a fait que le tissu s'est régénéré en restaurant l'architecture normale des cellules épithéliales et en préservant l'intégrité d'épithélium intestinale (Figure 21).

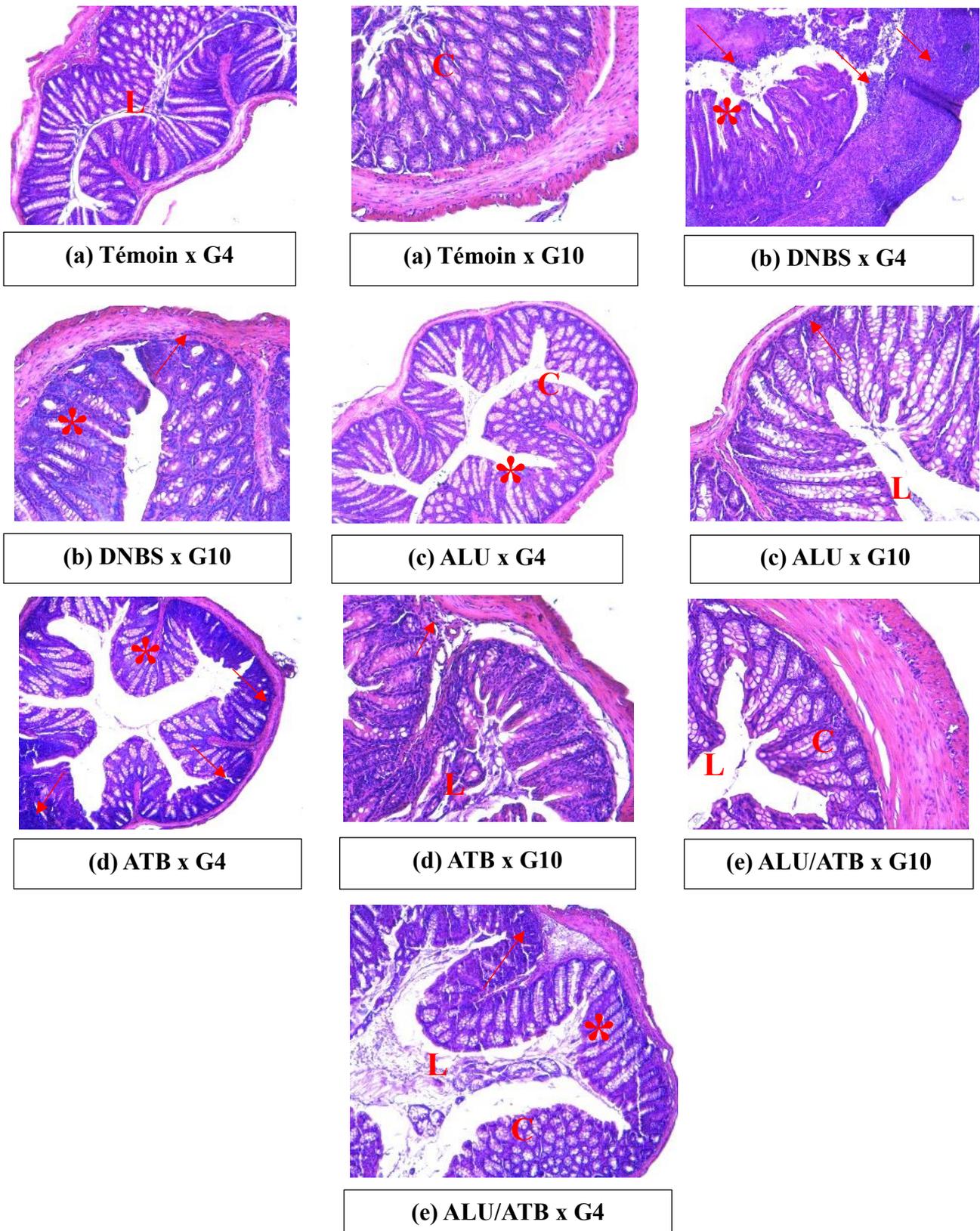


Figure 21 : Effet des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (50 mg/kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes *Linum usitatissimum* /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur l'aspect cellulaire dans un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS. Section histologique de la muqueuse colique colorée.

a) (lot témoin), (b) (lot DNBS), (c) (lot ALU), (d) (lot ATB), (e) (lot de l'association ALU/ATB) grossissement x4 et x10. (C : crypte normale ; L : lumière intestinale ; * : crypte endommagée ; flèche : infiltration inflammatoire).

III.1.4 Résultats de l'étude biochimique

III.1.4.1 Résultat du dosage de l'activité de monoxyde d'azote

L'administration du DNBS a augmenté le niveau de monoxyde d'azote (NO) dans le contrôle malade (9.34 ± 1.56) par rapport au contrôle non malade (2.005 ± 0.26), bien que ALU (50 mg /kg), ATB (25 mg/kg) et l'association ALU/ATB aient diminué de manière très significative ($p < 0.01$) le niveau de NO (3.07 ± 1.8 , 7.57 ± 1.72 et 2.5 ± 2.21) respectivement, par rapport au contrôle malade (Figure 22). Ces résultats ont révélés une amélioration de l'état du tissu des souris traitées avec ALU (50 mg /kg), ATB (25 mg/kg) et l'association ALU/ATB.

III.1.4.2 Résultat du dosage de l'activité de myéloperoxydase

L'inflammation sub-chronique induite par le DNBS a été associée à une augmentation de l'activité de la MPO, indiquant une infiltration massive de neutrophiles dans le tissu enflammé. Comme le montre la Figure 22, l'administration du DNBS a considérablement augmenté l'activité de la MPO dans le contrôle malade (6.85 ± 0.2) par rapport au contrôle non malade (4.12 ± 1.13) ($P < 0.01$), tandis que ALU (50 mg /kg), ATB (25 mg/kg) et l'association ALU/ATB ont montré une diminution très significative ($p < 0.01$) de son activité (3.52 ± 1.4 , 3.73 ± 0.38 , et 4.47 ± 1.12), respectivement par rapport au groupe non malade.

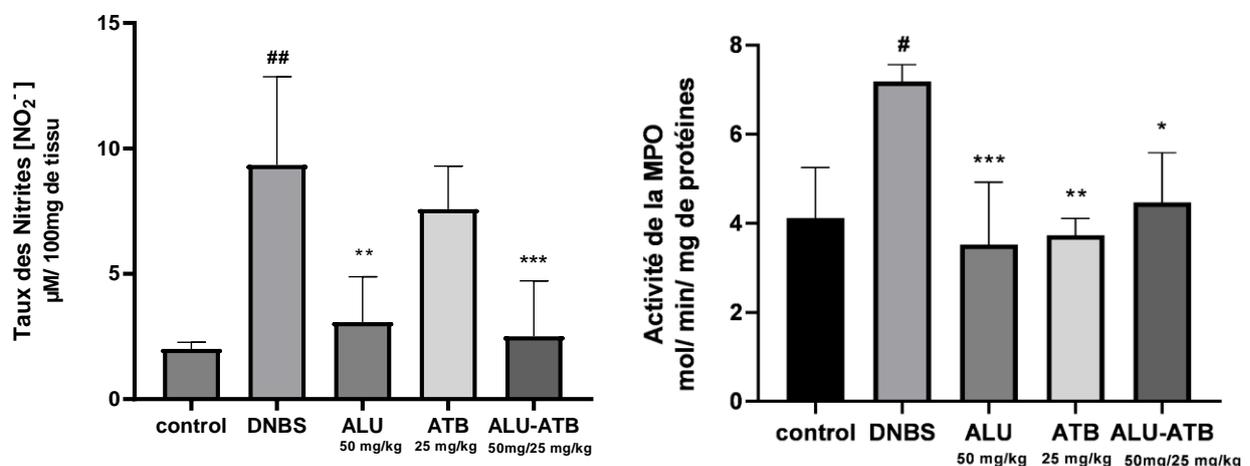


Figure 22 : Effets des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (50 mg /kg), doxycycline (25 mg/kg) et le mélange alcaloïdes /doxycycline (50 : 25 mg/kg) sur le taux du monoxyde d'azote (NO) et l'activité de la myéloperoxydase (MPO) dans un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS chez les souris.

III.2 Discussion

La présente étude a évalué pour la première fois les effets anti-inflammatoires intestinaux de l'association des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* et la doxycycline sur la l'inflammation intestinale induite par le DNBS chez les souris. Nos résultats préliminaires sont très encourageants, avec une amélioration de l'état clinique des souris, une réduction des dommages observés au niveau des tissus intestinaux, ainsi qu'une diminution des niveaux et de l'activité des marqueurs pro-inflammatoires et pro-oxydants évalués chez les souris traitées.

La barrière intestinale est une structure complexe constituée d'éléments chimiques, physiques et immunologiques qui maintiennent l'intégrité et la fonctionnalité biologique de l'intestin. Elle joue un rôle essentiel dans la prévention de l'invasion par des micro-organismes pathogènes. En cas d'inflammation intestinale, cette barrière peut être compromise, augmentant ainsi la perméabilité intestinale (**Fasano, 2012**). Cette augmentation de la perméabilité, souvent appelée "syndrome de l'intestin perméable", permet à des molécules indésirables et à des micro-organismes de traverser l'épithélium intestinal, déclenchant une réponse inflammatoire (**Salim et al., 2011**). Les jonctions serrées entre les cellules épithéliales peuvent se relâcher, ouvrant les espaces intercellulaires et diminuant ainsi l'intégrité de la barrière (**Zeissig et al., 2014**). La réponse inflammatoire subséquente soutenue est associée à une augmentation de l'expression de cytokines comme l'IL-12 et l'IL-17, ce qui est indicatif d'un déséquilibre dans les réponses Th1 et Th17 (**Neurath, 2014**). L'IL-17 a été décrite comme jouant un rôle clé dans le développement de l'inflammation intestinale chronique, car elle contribue à la migration des neutrophiles et à leur activation subséquente, c'est une cytokine qui participe dans l'amélioration de la maturation des cellules dendritiques, l'amorçage des lymphocytes T et la production de médiateurs inflammatoires par différents types cellulaires (**Algieri et al., 2013 ; Sanchez-Muñoz et al., 2008**).

L'utilisation de substances chimiques pour provoquer l'inflammation sub chronique chez les souris est largement adoptée comme méthode courante pour créer un modèle expérimental de maladie inflammatoire intestinale. L'administration de DNBS imite plusieurs caractéristiques cliniques et morphologiques fonctionnelles importantes de la maladie de Crohn (**Hunter et al., 2005**). Lors de son administration par voie intra rectale chez les souris, il induit une inflammation et des dommages tissulaires importants au niveau des côlons (**Martelli, 2007**). De plus, il provoque une nécrose des cellules épithéliales et des lésions ulcéreuses dans la muqueuse du côlon. Cette nécrose tissulaire est accompagnée d'une infiltration par des cellules immunitaires, notamment des neutrophiles et des lymphocytes (**Okayasu et al., 1990**).

Le processus inflammatoire intestinal induit par le DNBS chez les souris se caractérisait également par une expression altérée des différents marqueurs coliques. Ainsi, une augmentation significative de l'expression de différentes cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-12 et IL-17 (**Bribi et al., 2016**).

Il est évident que le groupe DNBS avait un rapport P/L du côlon et DAI plus élevé que les groupes traités et le contrôle non malade ce qui est similaires aux travaux précédents (**Bribi et al., 2016 ; Palla et al., 2016**).

Grâce à leur utilisation depuis des millénaires pour traiter diverses maladies, leur moindre incidence d'effets secondaires, leur disponibilité accrue et leur coût abordable, les médicaments traditionnels, notamment les produits à base de plantes, sont des sources précieuses pour l'identification de nouveaux composés bioactifs (**Gupta et al., 2022**). Par ailleurs, l'intérêt pour les thérapies complémentaires et alternatives dans le traitement des MICI a considérablement augmenté ces dernières années (**Langmead et al., 2006**).

Les graines de lin sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de la diarrhée et des infections gastro-intestinales (**Gruenwald et al., 2000 ; Duke et al., 2002**). Les extraits éthanolique et méthanolique de *Linum usitatissimum* ont démontré une activité anticancéreuse *in vitro* contre les cellules HepG2 et MCF7, en plus de leurs effets antioxydants et anti-inflammatoires (**Morsi et al., 2020**). Ces extraits éthanolique et méthanolique de graines de *Linum usitatissimum* montrent un potentiel d'être une source de nouvelles thérapies visant une variété de maladies liées à l'enzyme lipoxigénase (LOX) (**Raghad et al., 2022**). En outre, l'extrait hydroalcoolique de *Linum usitatissimum* réduit l'inflammation aussi bien dans les phases aiguës que chroniques (**Ebrahimi et al., 2014 ; Ansari et al., 2019**). L'extrait éthanolique et méthanolique de *Linum usitatissimum* augmentent significativement la présence des cellules caliciformes et réduisent l'infiltration des neutrophiles. De plus il diminue l'activité du MPO de manière significative expliquant la diminution de la pathologie de la maladie (**Palla et al., 2016**). Des études ont également identifié la présence d'alcaloïdes dans les extraits aqueux-méthanoliques et éthanoliques de *Linum usitatissimum* (**Palla et al., 2016 ; Palla et al., 2020 ; Thamilmaraï et al., 2019 ; Khan et al., 2019**).

La quantité des alcaloïdes était légèrement supérieure ou dans la même plage que celle trouvée dans d'autres extraits de *Linum usitatissimum* (**Merakeb et al., 2022 ; Bribi et al., 2023**).

Dans cette étude, les alcaloïdes de *Linum usitatissimum* ont montrés une réduction significative du P/L et DAI par rapport au contrôle malade. Ces résultats ont été confirmés par la coloration H&E qui est observé comme diminution des scores histologique et les lésion

tissulaires (**Bribi et al., 2023**). De même, une diminution significative de l'activité du MPO et des niveaux de NO a été observée. Ces résultats confirment l'activité anti-inflammatoire intestinale promues par ALU en réduisant l'agent pro-inflammatoire (NO) et l'enzyme pro-inflammatoire (MPO). En outre, des études antérieures ont montré que l'extrait des alcaloïdes totaux des graines de *Linum usitatissimum* présente des effets anti-inflammatoires et analgésiques significatifs sur des modèles chimiques et comportementaux d'inflammation et de nociception chez la souris (**Ferhat et al., 2021 ; Merakeb et al., 2022**).

La doxycycline est un antibiotique semi synthétique à large spectre, indépendant de son effet antimicrobien il a un effet direct sur la réponse immunitaire (**Garrido-Mesa et al., 2015**). La doxycycline exerce un effet antiinflammatoire intestinal dans le modèle TNBS de colite chez les rats. Macroscopiquement, la doxycycline a réduit de manière significative le P/L du côlon et le score de lésions coliques, qui est un effet lié à une réduction significative de la zone de tissu enflammé/nécrotique. L'effet anti-inflammatoire de la doxycycline a été également mis en évidence biochimiquement par la réduction de l'activité MPO colique et les marqueurs de l'infiltration des neutrophiles (**J.E. Krawisz et al., 1984 ; Morris et al., 1989**). La doxycycline a réduit la production colique des substances pro-inflammatoire tels que l'IL-1. De plus, les cellules caliciformes semblaient reconstituées avec leur teneur en mucine, ainsi qu'une réduction de l'infiltrat inflammatoire qui a été légère à modérée avec une distribution inégale. Ainsi une réduction importante des valeurs de DAI (**Garrido-Mesa et al., 2015**). L'expression génique des marqueurs pro-inflammatoires IL-6, TNF, IL-17 a été considérablement réduit après le traitement des rats colitique à la doxycycline (**Pavlick et al., 2002**). En outre, la doxycycline possède des propriétés immunomodulatrices du processus inflammatoire qui ont été confirmées *in vitro* et *in vivo*. De plus elle réduit la production de NO et de chimiokine IL-8 (**Garrido-Mesa et al., 2015**).

Dans cette étude nous avons confirmé l'activité anti-inflammatoire intestinale de la doxycycline chez les souris, par un DAI réduit, notamment une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires et une réduction de l'œdème. De plus, l'administration de la doxycycline aux souris a réduit le rapport P/L colique et l'activité de la MPO.

Nos résultats ont montré que l'administration orale des alcaloïdes des graines de *Linum usitatissimum* en association avec la doxycycline a exercé une restauration plus rapide et plus complète de l'intégrité des tissus intestinaux en comparaison avec le lot traité avec les alcaloïdes des graines de *Linum usitatissimum* et le lot traité avec la doxycycline séparément. Le DAI a été considérablement réduit dans le groupe traité avec l'association ALU/ATB associé avec une

diminution de l'infiltration des cellules inflammatoire. Ceci indique une amélioration globale de l'état de santé des souris, avec une réduction des symptômes cliniques tels que la perte de poids, la diarrhée et le saignement rectal. L'association des deux traitements a conduit à une augmentation des longueurs et à une diminution des poids des côlons en comparant au contrôle malade. Selon l'analyse histologique, le traitement avec l'association ALU/ATB a conduit à la régénération du tissu, en rétablissant l'architecture cellulaire normale et en préservant l'intégrité de l'épithélium intestinal. De plus, une réduction de l'infiltration lymphocytaire a été observée. Cette réduction est le résultat d'une baisse de la libération de NO et de l'activité enzymatique du MPO.

L'association des alcaloïdes des graines de lin avec la doxycycline peut offrir un double mécanisme d'action, où les alcaloïdes des graines de lin réduisent le stress oxydatif et les cytokines pro-inflammatoires (**Morsi *et al.*, 2020 ; Merakeb *et al.*, 2022**), tandis que la doxycycline inhibe autres médiateurs de l'inflammation et a un effet anti-bactérien contre les bactéries pathogènes (**Garrido-Mesa *et al.*, 2015**). Ce double effet pourrait expliquer la synergie observée dans la réduction de l'inflammation. Cette combinaison présente un potentiel thérapeutique prometteur pour la gestion de l'inflammation intestinale. Les résultats indiquent une amélioration significative des marqueurs inflammatoires, de la morphologie des tissus et de l'indice d'activité de la maladie. Ces observations encouragent à continuer les recherches pour comprendre les mécanismes mis en jeu et tester l'efficacité et l'innocuité de cette combinaison chez l'homme.

Conclusion

Conclusion et perspectives

En conclusion, nos résultats indiquent que l'association des alcaloïdes totaux de *Linum usitatissimum* et l'antibiotique (doxycycline) a réduit l'inflammation intestinale dans le modèle murin de la colite provoquée par le DNBS. Cet effet bénéfique était corrélé à la diminution des dommages macroscopiques par l'amélioration de la morphologie colique, la réduction de l'indice d'activité de la maladie, ainsi que l'augmentation des longueurs et la diminution des poids des colons chez les souris.

Le potentiel anti-inflammatoire intestinal des alcaloïdes des graines de lin et la doxycycline séparément ont montrés une diminution du rapport P/L, l'indice de l'activité de la maladie et une réduction des marqueurs pro-inflammatoires chez les souris BALB/c, bien que l'association de ces alcaloïdes des grains de lin et de la doxycycline ont décrit pour la première fois dans la présente étude une diminution importante des marqueurs pro-inflammatoires, une diminution du rapport P/L et l'indice de l'activité de la maladie chez les mêmes souris. L'étude histologique a montré une régénération des tissus coliques et une diminution des différents marqueurs pro-inflammatoires tels que le taux du NO et l'activité de la MPO chez les groupes traités par les ALU des graines de lin et l'ATB séparément et chez le groupe traité par l'association ALU/ATB ce qui contribue très probablement à réduire les lésions tissulaires et l'altération de la réponse immunitaire observée chez les souris atteintes par les MICI.

L'ensemble des résultats obtenus ont démontré que l'association entre la doxycycline et les alcaloïdes de *Linum usitatissimum* pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin avec un meilleur effet thérapeutique et moins d'effets secondaires. Cependant, il convient de noter que cette étude reste préliminaire et nécessite des recherches complémentaires approfondies au niveau moléculaire pour mieux comprendre les mécanismes d'action et la synergie des deux traitements, ainsi que la caractérisation des alcaloïdes *Linum usitatissimum* par HPLC-MS/MS et GCMS pour déterminer et identifier les molécules actives.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

(A)

- Ahmed, S. (1998). *Isolation and Structural elucidation of chemical constituents from Fumaria indica, Ferula oopoda and Withania somnifera* (Doctoral dissertation, University of Karachi Karachi).
- Algieri, F., Zorrilla, P., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, N., Banuelos, O., González-Tejero, M. R., ... & Galvez, J. (2013). Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Journal of ethnopharmacology*, 146(3), 750-759.
- Alpan, O., Rudomen, G., & Matzinger, P. (2001). The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *The Journal of Immunology*, 166(8), 4843-4852.
- Ananthkrishnan, A. N., Khalili, H., Konijeti, G. G., Higuchi, L. M., de Silva, P., Fuchs, C. S., ... & Chan, A. T. (2014). Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 63(5), 776-784.
- Anderson, C. A., Boucher, G., Lees, C. W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K. D., ... & Rioux, J. D. (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature genetics*, 43(3), 246-252.
- Ansari, R., Zarshenas, M. M., & Dadbakhsh, A. H. (2019). A Review on Pharmacological and Clinical Aspects of *Linum usitatissimum* L. *Current drug discovery technologies*, 16(2), 148-158.

(B)

- Bach, S. P., & Mortensen, N. J. (2007). Ileal pouch surgery for ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(24), 3288.
- Bekhit, A. E. D. A., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch, J., Teh, S., Ahmed, I. A. M., ... & Bekhit, A. A. (2018). Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 13, 129-152.
- Belizário, J. E., & Napolitano, M. (2015). Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers in microbiology*, 6, 151578.
- Beroual, K., Maameri, Z., Halmi, S., Benleksira, B., Agabour, A., & Pacha, Y. H. (2013). Effects of *Linum usitatissimum* L. ingestion and oil topical application on hair growth in rabbit, 3, 459-463.

- Berrebi, D., Besnard, M., Fromont-Hankard, G., Paris, R., Mougenot, J. F., De Lagausie, P., ... & Peuchmaur, M. (1998). Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn's disease. *The American journal of pathology*, 152(3), 667.
- Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: a review. *Asian journal of botany*, 1(1), 1-6.
- Bribi, N., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Garrido-Mesa, J., Utrilla, M. P., ... & Galvez, J. (2016). Intestinal anti-inflammatory effects of total alkaloid extract from *Fumaria capreolata* in the DNBS model of mice colitis and intestinal epithelial CMT93 cells. *Phytomedicine*, 23(9), 901-913.
- Bribi, N., Merakeb, M. S., & Boudaoud-Ouahmed, H. (2023). Intestinal Anti-inflammatory Effects of *Linum usitatissimum* Alkaloid on Experimental Ulcerative Colitis in BALB/c Mice. *Current Bioactive Compounds*, 19(8), 69-74.
- Brown, C. J., MacLean, A. R., Cohen, Z., MacRae, H. M., O'Connor, B. I., & McLeod, R. S. (2005). Crohn's disease and indeterminate colitis and the ileal pouch-anal anastomosis: outcomes and patterns of failure. *Diseases of the colon & rectum*, 48(8), 1542-1549.

(C)

- Carbon, C. (2000). L'usage judicieux des antibiotiques: une arme essentielle pour contrôler la résistance bactérienne. *MEDECINE ET HYGIENE*, 1963-1966.
- Chopra I, Roberts M. (2001). Antibiotiques tétracyclines : mode d'action, applications, biologie moléculaire et épidémiologie de la résistance bactérienne. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 232–60.
- Coşkuner, Y., & Karababa, E. (2007). Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of food Engineering*, 78(3), 1067-1073.
- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 18(3), 481-496.
- Cushnie, T. T., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International journal of antimicrobial agents*, 44(5), 377-386.

(D)

- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Dharmasiri, M. G., Jayakody, J. R. A. C., Galhena, G., Liyanage, S. S. P., & Ratnasooriya, W. D. (2003). Anti-inflammatory and analgesic activities of mature fresh leaves of *Vitex negundo*. *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 199-206.
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., ... & Cho, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *science*, 314(5804), 1461-1463.

(E)

- Ebrahimi, V. K. S., Talebi, M. S. A., & Naseri, M. (2014). Anti-inflammation effect of alcoholic extract of *Linum Usitatissimum* L. in male rats. *Majallah-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki-i Babul*, 16(4), 50-56.

(F)

- Fan, Y. F., Xie, Y., Liu, L., Ho, H. M., Wong, Y. F., Liu, Z. Q., & Zhou, H. (2012). Paeoniflorin reduced acute toxicity of aconitine in rats is associated with the pharmacokinetic alteration of aconitine. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(2), 701-708.
- Fasci-Spurio, F., Meucci, G., Papi, C., & Saibeni, S. (2017). The use of oral corticosteroids in inflammatory bowel diseases in Italy: an IG-IBD survey. *Digestive and Liver Disease*, 49(10), 1092-1097.
- Ferhat, R., Bribi, N., Merakeb, M. S., & Betitra, Y. (2021). Anti-inflammatory and analgesic effect of an alkaloid-fixed oil mix from *Linum usitatissimum* seeds in vivo. *Genetics & Biodiversity Journal*, 5(2), 68-76.

(G)

- Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A. P., & Hashash, J. G. (2018). A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-month*, 64(2), 20-57.
- Ganorkar, P. M., & Jain, R. K. (2013). Flaxseed--a nutritional punch. *International Food Research Journal*, 20(2).

- Garrido-Mesa, J., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Utrilla, M. P., Rodriguez-Cabezas, M. E., Zarzuelo, A., ... & Galvez, J. (2015). A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. *Pharmacological Research*, *97*, 48-63.
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., ... & Xavier, R. J. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, *15*(3), 382-392.
- Gilani, A. H. (2005). Trends in ethnopharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, *100*(1-2), 43-49.
- Goyal, M., Ghosh, M., Nagori, B. P., & Sasmal, D. (2013). Analgesic and anti-inflammatory studies of cyclopeptide alkaloid fraction of leaves of *Zizyphus nummularia*. *Saudi journal of biological sciences*, *20*(4), 365-371.
- GRAS, G., & CHOUTET, P. (2010). PRESCRIPTION ET SURVEILLANCE DES ANTIBIOTIQUES. *La Revue du praticien (Paris)*, *60*(4), 573-579.
- Guillemot, D., & Leclercq, R. (2005). Impact de l'exposition des populations sur le risque de résistance bactérienne. *Médecine et maladies infectieuses*, *35*, S212-S220.
- Guillotin, V., Galli, G., & Viillard, J. F. (2018). Intérêt de la recherche du polymorphisme de la thiopurine méthyltransférase et du dosage des métabolites chez les patients traités par azathioprine. *La Revue de Médecine Interne*, *39*(6), 421-426.
- Gupta, M., Mishra, V., Gulati, M., Kapoor, B., Kaur, A., Gupta, R., & Tambuwala, M. M. (2022). Natural compounds as safe therapeutic options for ulcerative colitis. *Inflammopharmacology*, *30*(2), 397-434.

(H)

- Halligudi, N. (2012). Pharmacological properties of flax seeds: a Review. *Hygeia. J. D. Med*, *4*, 70-77.
- Hesse, M. (2002). *Alkaloids: nature's curse or blessing*. John Wiley & Sons.
- Holmes, N. E., & Charles, P. G. (2009). Safety and efficacy review of doxycycline. *Clinical Medicine. Therapeutics*, *1*, CMT-S2035.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., ... & Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, *411*(6837), 599-603.

- Hur, S. J., Kang, S. H., Jung, H. S., Kim, S. C., Jeon, H. S., Kim, I. H., & Lee, J. D. (2012). Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutrition research*, 32(11), 801-816.

(I)

- Iserin, P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales. *Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersiey Limited, Londres*, 241.

(J)

- Jacobs MR, Bajaksouzian S, Windau A (2004). Sensibilité de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* à 17 agents antimicrobiens oraux sur la base de paramètres pharmacodynamiques: étude de surveillance américaine de 1998 à 2001. *Clin Lab Med*, 24, 503-30.

- Jandali, R., & Agha, M. I. (2022). Lipoxygenase Inhibitory Activity of Some Extracts Prepared from Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Current Bioactive Compounds*, 18(3), 65-71.

- Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.

- Jodh, R., Tawar, M., Gomkale, K., Jari, S., Topley, J., & Faisal, N. (2022). An updated review on doxycycline. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*, 14(4), 253-256.

- Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. (2004). Utilisation de la doxycycline pour la pneumonie communautaire : spectre d'activité in vitro contemporain contre *Streptococcus pneumoniae* (1999-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 49, 147-9.

- Jurjus, A. R., Khoury, N. N., & Reimund, J. M. (2004). Animal models of inflammatory bowel disease. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 50(2), 81-92.

(K)

- Kang, S., Kim, W., Jeong, S., Lee, Y., Nam, J., Lee, S., & Jung, Y. (2017). Oxidized 5-aminosalicylic acid activates Nrf2-HO-1 pathway by covalently binding to Keap1: Implication in anti-inflammatory actions of 5-aminosalicylic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 715-724.

- Kayama, H., & Takeda, K. (2012). Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. *International immunology*, 24(11), 673-680.

- Khalili, H., Huang, E. S., Ananthakrishnan, A. N., Higuchi, L., Richter, J. M., Fuchs, C. S., & Chan, A. T. (2012). Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut*, 61(12), 1686-1692.
- Khan, H. (2017). Anti-inflammatory potential of alkaloids as a promising therapeutic modality. *Letters in Drug Design & Discovery*, 14(2), 240-249.
- Khan, H., Nabavi, S. M., Sureda, A., Mehterov, N., Gulei, D., Berindan-Neagoe, I., ... & Atanasov, A. G. (2018). Therapeutic potential of songorine, a diterpenoid alkaloid of the genus *Aconitum*. *European journal of medicinal chemistry*, 153, 29-33.
- Khan, Z. J., Khan, N. A., Naseem, I., & Nami, S. A. (2019). Exploration of physicochemical and phytochemical potential of *Linum usitatissimum* Linn (Tukhm-e-Katan). *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(3), 551-558.
- Khattak, S., & Khan, H. (2016). Anti-cancer potential of phyto-alkaloids: a prospective review. *Current Cancer Therapy Reviews*, 12(1), 66-75.
- Kökten, T., Hansmannel, F., Melhem, H., & Peyrin-Biroulet, L. (2016). Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *Hegel*, 6(2), 119-129.
- Krawisz, J. E., Sharon, P., & Stenson, W. F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity: assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, 87(6), 1344-1350.

(L)

- Langmead, L., & Rampton, D. S. (2006). Complementary and alternative therapies for inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 23(3), 341-349.
- Lemann, M. (1993). Traitement des maladies inflammatoires : état actuel et perspectives. *MS. Médecine sciences*, 9(8-9), 875-883.
- Louis, E., & Marteau, P. (2009). *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*. Doin, 2010, 140-250.

(M)

- Machado, A. M., de Paula, H., Cardoso, L. D., & Costa, N. M. (2015). Effects of brown and golden flaxseed on the lipid profile, glycemia, inflammatory biomarkers, blood pressure and body composition in overweight adolescents. *Nutrition*, 31(1), 90-96.

- Maillard, V., Bougnoux, P., Ferrari, P., Jourdan, M. L., Pinault, M., Lavillonnière, F., ... & Chajès, V. (2002). N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *International Journal of Cancer*, 98(1), 78-83.
- Maloy, K. J., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 298-306.
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., ... & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2), 205-211.
- Marafini, I., Sedda, S., Dinallo, V., & Monteleone, G. (2019). Inflammatory cytokines: from discoveries to therapies in IBD. *Expert opinion on biological therapy*, 19(11), 1207-1217.
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadoux, J. J., Sokol, H., ... & Langella, P. (2014). The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflammatory bowel diseases*, 20(3), 417-430.
- Mawdsley, J. E., & Rampton, D. S. (2005). Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 54(10), 1481-1491.
- McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., Florin, T. H., & Radford-Smith, G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 15(1), 100-113.
- Merakeb, M. S., Bribi, N., Ferhat, R., & Yanat, B. (2023). Inhibitory effects of linum usitatissimum alkaloid on inflammatory and nociceptive responses in mice. *Current Bioactive Compounds*, 19(2), 56-62.
- Merakeb, M. S., Bribi, N., Ferhat, R., Aziez, M., & Yanat, B. (2022). Alkaloids Extract from *Linum usitatissimum* Attenuates 12-OTetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA)-induced Inflammation and Oxidative Stress in Mouse Skin. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, 21(3), 179-187.
- Miossec, P. (2018). Cibles des biothérapies au cours des maladies inflammatoires. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 202(8-9), 1917-1926.
- Moreira, R., Pereira, D. M., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2018). Pyrrolizidine alkaloids: chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1668.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., & Wallace, J. L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96(2), 795-803.

- Morrissey, I., Robbins, M., Viljoen, L., Brown DF. (2005). Sensibilité aux antimicrobiens des agents pathogènes des voies respiratoires acquis dans la communauté au Royaume-Uni en 2002/3, déterminée localement et centralement par les méthodes BSAC. *J Chimiothérapie antimicrobienne*, 55, 200–8.
- Morsi, E. A., Ahmed, H. O., Abdel-Hady, H., El-Sayed, M., & Shemis, M. A. (2020). GC-analysis, and Antioxidant, Anti-inflammatory, and Anticancer Activities of Some Extracts and Fractions of *Linum usitatissimum*. *Current Bioactive Compounds*, 16(9), 1306-1318.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 331-341.
- Muir, A. D., & Westcott, N. D. (Eds.). (2003). *Flax: the genus Linum*. CRC press.

(N)

- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329-342.
- Neurath, M. F. (2019). Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nature immunology*, 20(8), 970-979.

(P)

- Palla, A. H., Gilani, A. U. H., Bashir, S., & Ur Rehman, N. (2020). Multiple mechanisms of flaxseed: Effectiveness in inflammatory bowel disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1), 7974835.
- Palla, A. H., Iqbal, N. T., Minhas, K., & Gilani, A. H. (2016). Flaxseed extract exhibits mucosal protective effect in acetic acid induced colitis in mice by modulating cytokines, antioxidant and antiinflammatory mechanisms. *International immunopharmacology*, 38, 153-166.
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., ... & Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *The American journal of pathology*, 150(3), 823.
- Pavlick, K. P., Laroux, F. S., Fuseler, J., Wolf, R. E., Gray, L., Hoffman, J., & Grisham, M. B. (2002). Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 311-322.
- Picco, M. F., & Cangemi, J. R. (2009). Inflammatory bowel disease in the elderly. *Gastroenterology Clinics*, 38(3), 447-462.

- Podolsky, D. K. (2002). The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 16(6), 933-943.

(R)

- Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., ... & Brant, S. R. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics*, 39(5), 596-604.

- Robinson, T. (2000). The Metabolism and Biochemical Actions of Alkaloids in Animals. *Studies in Natural Products Chemistry*, 22, 3-54.

- Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., ... & Roda, E. (2010). Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(34), 4264.

(S)

- Sales-Campos, H., Basso, P. J., Alves, V. B. F., Fonseca, M. T. C., Bonfá, G., Nardini, V., & Cardoso, C. R. B. (2014). Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48, 96-107.

- Samaan, M. A., Bagi, P., Castele, N. V., D'Haens, G. R., & Levesque, B. G. (2014). An update on anti-TNF agents in ulcerative colitis. *Gastroenterology Clinics*, 43(3), 479-494.

- Sanchez-Muñoz, F., Dominguez-Lopez, A., & Yamamoto-Furusho, J. K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 14(27), 4280.

- Sartor, R. B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134(2), 577-594.

- Scaldaferri, F., Gerardi, V., Lopetuso, L. R., Del Zompo, F., Mangiola, F., Boškoski, I., ... & Gasbarrini, A. (2013). Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *BioMed research international*, 2013(1), 435268.

- Seksik, P., Contou, J. F., Ducrotté, P., Faucheron, J. L., & De Parades, V. (2004). Traitement de la rectocolite ulcéro-hémorragique dans sa forme distale. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 28(10), 964-973.

- Shaukat, B., Mehmood, M. H., Shah, S., & Anwar, H. (2022). Ziziphus Oxyphylla hydro-methanolic extract ameliorates hypertension in L-NAME induced hypertensive rats through

NO/cGMP pathway and suppression of oxidative stress related inflammatory biomarkers. *Journal of Ethnopharmacology*, 285, 114825.

- Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y., & Reaney, M. J. (2014). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in food science & technology*, 38(1), 5-20.

- Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y., & Reaney, M. J. (2014). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in food science & technology*, 38(1), 5-20.

- Siegel, C. A. (2011). explaining risks of inflammatory bowel disease therapy to patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 33(1), 23-32.

- Smith, K. M., Davidson, J. M., & Garside, P. (2002). T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cells display a defect in cell division. *Immunology*, 106(2), 144-158.

- Solomon, M. J., McLeod, R. S., O'Connor, B. I., Steinhart, A. H., Greenberg, G. R., & Cohen, Z. (1993). Combination of ciprofloxacin and metronidazole in severe perianal Crohn's disease. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 7(7), 571-573.

(T)

- Thamilmarai Selvi, B., Priya, N. S., Steffi, P. F., & Priyadarshni, S. (2019). Phytochemical evaluation, GC-MS analysis of phytoactive compounds, and antibacterial activity studies from *linum usitatissimum*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12, 141-149.

- Travis, S. P. L., Stange, E. F., Lémann, M., Öresland, T., Chowers, Y., Forbes, A., ... & Mortensen, N. J. (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut*, 55(suppl 1), i16-i35.

- Ungaro, R., Mehandru, S., Ballen, P., Peyrin-Biroulet, L., Colombel, J-F. (2017). Ulcerative colitis. *THE LANCET*. (Seminar) 389, 1756-1770.

(X)

- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434.

(Z)

- Zhang, J., Long, Y., Wang, L., Dang, Z., Zhang, T., Song, X., ... & Pei, X. (2018). Consensus genetic linkage map construction and QTL mapping for plant height-related traits in linseed flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC plant biology*, 18, 1-12.

Annexes

Annexes I : Réactifs

- Acide hydrochlorique HCl.
- Acide trichloroacétique (TCA 35%).
- Ammoniaque.
- Chloroforme (CHCl₃).
- Dichloromethane.
- Diéthyle éther.
- DNBS.
- Dragendorff.
- Eau distillée.
- Eosine.
- Dianisidine.
- Ethanol (C₂H₆O).
- Ether de pétrole.
- Eukitt.
- Formol.
- Hexadécyltriméthylammonium bromide (HTAB).
- Hématoxyline.
- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- Paraffine.
- Tampon phosphate salin (PBS).
- Xylène.

Annexes II : Equipement

- ✓ Ampoule de décantation.
- ✓ Appareille d'enrobage.
- ✓ Automate de déshydratation.
- ✓ Balance.
- ✓ Barreaux magnétiques.
- ✓ Béchers.
- ✓ Biberons.
- ✓ Cages.
- ✓ Ciseaux.
- ✓ Cristallisateur.
- ✓ Entonnoirs en verre.
- ✓ Eppendorf.
- ✓ Eprouvettes.
- ✓ Étuve.
- ✓ Histocassettes.
- ✓ Homogénéisateurs.
- ✓ Hotte.
- ✓ Lames et lamelles.
- ✓ Micropipette.

- ✓ Microscope.
- ✓ Microtome.
- ✓ Pincés.
- ✓ Plaque agitatrice.
- ✓ Plaque chauffante.
- ✓ Plaque réfrigérante.
- ✓ Centrifugeuse.
- ✓ Réfrigérant.
- ✓ Règles.
- ✓ Seringues.
- ✓ Sonde de gavage.
- ✓ Spatules.
- ✓ Spectrophotomètre et cuves.
- ✓ Glacière.
- ✓ Dessiccateur.
- ✓ Sonicateur.
- ✓ Portoires.
- ✓ Vortex.

Résumé

Les thérapies alternatives pour la gestion des troubles inflammatoires de l'intestin se développent progressivement au fil du temps, démontrant une efficacité croissante et un profil de sécurité adéquat. La présente étude visait à évaluer l'effet anti-inflammatoire intestinale *in vivo* de l'association des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* et l'antibiotique (doxycycline) sur un modèle d'inflammation sub-chronique induite par le DNBS chez des souris BALB/c.

L'effet anti-inflammatoire intestinal de l'ALU (50 mg/kg), ATB (25 mg/kg) et l'association ALU/ATB (50 : 25 mg/kg) a été évalué sur un modèle de 15 jours.

Le mélange a réduit significativement l'inflammation intestinale avec une diminution significative du rapport Poids/Longueur et le DAI avec une amélioration du profil histologique, ce qui ont été confirmé par l'étude biochimique qui avait démontré une diminution significative du taux du NO et l'activité de la MPO.

Ces résultats suggèrent que cette association pourrait constituer un nouveau traitement des MICI.

Mots clés : Anti-inflammatoire, DNBS, Doxycycline, *Linum usitatissimum*, mélange, MICI.

Abstract

Alternative therapies in the management of inflammatory bowel disorders are growing over time, offering increased efficacy and an appropriate safety profile. The present study aimed to evaluate the intestinal anti-inflammatory effect of the alkaloid mixture of *Linum usitatissimum* and the antibiotic (doxycycline) *in vivo* on a model of DNBS-induced sub-chronic inflammation in BALB/c mice.

The intestinal anti-inflammatory effect of ALU (50 mg/kg), ATB (25 mg/kg) and the ALU/ATB mixture (50mg/25 mg/kg) was evaluated after 15 days.

The mixture significantly reduced intestinal inflammation, with a significant decrease of the weight/length ratio, and DAI, with an improved histological profile. This was confirmed by the biochemical study, which showed a significant decrease of NO and MPO.

These results suggest that this combination could be a new treatment for IBD.

Key words: Anti-inflammatory, DNBS, Doxycycline, *Linum usitatissimum*, mixture, IBD.

ملخص

تتزايد العلاجات البديلة في إدارة اضطرابات الأمعاء الالتهابية بمرور الوقت مما يوفر فعالية متزايدة وملف أمان مناسب. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم التأثير المعوي المضاد للالتهابات في الجسم الحي لمزيج من قلويدات بذور الكتان والمضاد الحيوي (الدوكسيسيكالين) على نموذج من الالتهاب شبه المزمن الناتج عن DNBS في فئران BALB/c. تم تقييم التأثير المضاد للالتهابات المعوية لكل من قلويدات بذور الكتان (50 مجم/كجم) والمضاد الحيوي (الدوكسيسيكالين) (25 مجم/كجم) والخليط (50 مجم/كجم) بعد 15 يومًا.

قلل الخليط بشكل كبير من التهاب الأمعاء مع انخفاض كبير في نسبة الوزن/الطول و مؤشر نشاط المرض مع تحسن في المظهر النسيجي، وهو ما أكدته الدراسة الكيميائية الحيوية التي أظهرت انخفاضًا كبيرًا في أكسيد النيتروجين والانزيم MPO.

تشير هذه النتائج إلى أن هذا المزيج يمكن أن يشكل علاجاً جديداً لمرض الأمعاء الالتهابي.

الكلمات المفتاحية: مضاد للالتهابات، DNBS، دوكسيسيكالين، بذور الكتان، خليط، مرض التهاب الأمعاء.