

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Physico-chimique
Spécialité Pharmaco-toxicologie



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Activité anti-inflammatoire intestinale des
alcaloïdes de *Linum usitassimum***

Présenté par :

ADOUANE Nouha & MEZMATE Lilia

Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr. HERFI Toufik

Mr. BRIBI Nordine

Mme. MOULAOUI Kenza

MA

MCA

MCB

Président

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

En tout premier lieu, on remercie le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Nos vifs remerciements s'adressent à nos parents qui nous ont aidés à la réalisation de ce modeste mémoire

Notre plus grande gratitude va à notre encadreur, Mr BRIBI, pour sa disponibilité et la confiance qu'il nous a accordé. On aimerait aussi le remercier pour ses précieux conseils qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

On exprime toute notre reconnaissance à Monsieur HERFI pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire. Que Mme MOULAOUI trouve ici l'expression de nos sincères remerciements pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Afin de n'oublier personne, nos vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui nous ont aidés à la réalisation de ce modeste mémoire



Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents; aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur; ma sœur ``Hadjila`` que j'adore.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à mes frères, mes belles sœurs mes nièces Katia, Radia, Leticia, Lina, Emilia; je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et frères de cœur, Raouf, Yasmina, Katia, Sihem.

A ma binôme Lilia et toute la famille MEZMATE.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Nouha



A mes chers parents : 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.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

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

Aux personnes qui me sont très chers, qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés : Hichem, Faty, Ilhem et Bicha Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A ma binôme Nouha et toute la famille ADOUANE.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Lilia

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-1	Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI).....	2
I-1.1	La maladie de Crohn.....	2
I-1.2	La rétro-colite hémorragique.....	3
I-1.3	Traitements des MICI.....	3
I-2	Généralités sur les linacées.....	8
I-2.1	La graine de lin.....	8
I-3	Les alcaloïdes	9
I-3.1	Classification.....	10
I-3.2	Caractérisation des allcaloides.....	10
I-3.3	Propriétés physico-chimiques.....	11
I-3.4	Actions pharmacologiques.....	11

Chapitre II : Matériels et méthodes

II-1	Matériel.....	12
II-1.1	Matériel végétale.....	12
II-1.2	Matériel et réactif.....	12
II-1.3	Matériel animal et conditions d'élevage.....	12
II-2	Méthodes.....	13
II-2.1	É EXTRACTION DES ALCALOÏDES.....	13

II-2.2	Évaluation de la toxicité aigue.....	15
II-2.3	Étude de l'activité anti-inflammatoire intestinale.....	15
II-2.4	Évaluation des dommages macroscopiques	16
II-2.5	Étude statistique.....	17

Chapitre III : Résultats et discussion

III- 1	Résultats.....	18
III-1.1	Extraction des alcaloïdes totaux de <i>Linum usitassimum</i>	18
III-1.2	Etude de la toxicité aigue.....	18
III-1.3	Étude de l'activité anti-inflammatoire intestinale.....	19
III-1.3.1	Étude de l'activité anti-inflammatoire aigue (48h).....	19
III-3.1.2	Étude de l'activité anti-inflammatoire subaiguë (5jours).....	21
III-2	Discussion.....	25
	Conclusion.....	28

Références bibliographiques

Annexe

Glossaire

Liste des abréviations

AA : Acide acétique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGL : Alcaloïdes graines de lin

ALA : α -linoléinique

ARN : Acide ribonucléique

CAT: Catalase

CEI : cellules épithéliales intestinales

COX-2: Cyclo-oxygénase-2

DL50: Dose létale qui tue 50% des animaux

EROs : Espèces réactives de l'oxygène

FSNV : faculté science de la nature et de la vie

GABA : acide-aminobutyrique

GI : tractus gastro-intestinal

GPx: Glutathion peroxydase

GSH: Glutathion s hydrolase

HCL : Acide chlorhydrique

HGPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase

HOCl : acide hypochloreux

IL: Interleukine

INF γ : Interféron gamma

iNOS: oxyde nitrique synthase inductible

IPAA : iléo-pouchienne

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

Th : lymphocytes T auxiliaires

LES : lupus érythémateux systémique

MC : maladie de Crohn

MDA : Malondialdehyde

MUC-2 : Mucine 2

NO : Oxyde nitrique

ONAB : office national des aliments du bétail

PDE4 : Inhibiteur de la PDE4

Ph : potentiel hydrogène

RCH : recto-colite hémorragique

SOD : Superoxyde dismutases

TPMT : thiopurine méthyltransférase

UC : colite ulcéreuse

XO : xanthine oxydase

6-TGNs : 6-thioguanines

6-MP : 6-mercaptopurine

6-MMP : 6-méthylmercaptopurine

6-TU : acide thiourique

Liste des figures

Figure 1	segments du tube digestif pouvant être atteint en cas de RCH et MC.....	2
Figure 2	Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCH.....	3
Figure 3	Mécanisme d'action des Aminosalicylates.....	4
Figure 4	Impact des corticoïdes dans la cascade arachidonique. En inactivant la phospholipase A ₂ , les corticoïdes inhibent toutes les voies à partir de l'acide arachidonique.....	5
Figure 5	Mécanismes d'action établis et possibles de l'infliximab et d'autres anticorps monoclonaux anti-TNF- α dans MICI.....	5
Figure 6	Métabolisme de l'azathioprine après administration.....	6
Figure 7	Anastomose iléo-rectale (A) et anastomose iléo-pouchienne (B).....	7
Figure 8	Structure moléculaire de quelques alcaloïdes.....	10
Figure 9	Graines de lin.....	11
Figure 10	Photographie de souris albinos de souche NMRI.....	12
Figure 11	Protocole d'extraction des alcaloïdes a partie des grains de lin.....	15
Figure 12	Administration de l'acide acétique par voie rectale (A), et l'administration des alcaloïdes des graines de lin par gavage(B).....	16
Figure 13	Effet des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (50, 500 et 2000 mg/kg) sur la variation du poids des souris pendant 5 jours.....	19
Figure 14	Morphologie et longueur des colons des différents lots (A), et l'aspect de l'inflammation intestinale du colon des souris acide acétique par rapport au control (B).....	20
Figure 15	Effets des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (12.5, 25 et 50mg/kg) sur l'évolution du rapport P/L en mg/cm dans un model de souris colitique induite par l'acide acétique a 5%.....	21
Figure 16	Morphologie et longueur des colons des différents lots (A), et l'aspect de l'inflammation intestinale du colon des souris acide acétique par rapport au control (B).....	22
Figure 17	Effet des alcaloïdes de <i>Linum usitatissimum</i> (12,5 et 50 mg/kg) sur la variation du poids corporel des souris pendant 4 jours.....	23
Figure 18	Effets de la fraction des alcaloïdes totaux (AGL) (12.5, et 50mg/kg) sur l'évolution du rapport P/L en mg/cm dans un model de souris colitique induite par l'acide acétique a 5%.....	24

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau I	Composition chimique (%) des grains de lin.....	9
Tableau II	Taux de létalité chez les souris NMRI traités par la fraction AGL.....	18
Tableau III	Évaluation des comportements et symptômes des souris pendant l'étude de la toxicité aigue.....	19

Introduction

L'inflammation est une étape nécessaire dans la réponse immunitaire mais peut s'avérer grave pour les tissus en se transformant en inflammation chronique comme dans le cas des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), dans ce cas elle doit être contrôlée et traitée. A ce jour le traitement des MICI se fait par l'utilisation de médicaments qui ne sont pas très efficaces car ils sont dotés d'inconvénients, tels que les accidents gastro-intestinaux et la sensibilité aux infections, limitant leurs utilisation a long terme.

La recherche scientifique s'est concentrée ces dernières années sur les plantes médicinales, il existe cependant des produits naturels tels que les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes utilisés en phytothérapie par les populations sans causer de risques et qui font la preuve de leur efficacité. L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables y compris des activités anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques avec moins d'effets secondaires ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques (Shukla et al, 2010). *Linum usitatissimum* fait partie des plantes les plus employées en médecine traditionnelle en raison des diverses propriétés de ses différentes parties notamment sa graine qui est documentée pour avoir un rôle bénéfique dans les MICI (Palla et al, 2016). La graine de lin englobe de nombreux composés et éléments biologiquement actifs, y compris les alcaloïdes, l'acide linoléique, l'acide linoléique, les lignanes, les peptides cycliques et les polysaccharides (Ganorkar et Jain, 2013; Shim et al, 2014). Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires des plantes, dotés de propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antibactériennes, anti-dépressives et anti-oxydantes (Khan, 2007; Khan et al, 2017).

Le but de la présente étude vise à déterminer la toxicité aiguë et l'effet des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* sur la colite ulcéreuse. La colite a été induite par l'administration rectale de 5% d'acide acétique chez des souris albinos de souche NMRI.

I-1 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique, celles-ci se caractérisent par une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal. Chez certains patients, les signes observés ne permettent pas de définir de quel MICI s'agit il, on parle alors de colite indéterminée (Sairenji et al, 2017; Hansen et al, 2010; Loureiro et Barbosa, 2018).

Les MICI se caractérisent le plus souvent par des douleurs abdominales, des diarrhées sanglantes, (fissure, abcès), de fatigue, perte d'appétit et un risque de cancer gastro-intestinal. Les causes de ces maladies inflammatoires restent mal connues mais il est généralement admis qu'elles sont multifactorielles associant des facteurs environnementaux et génétiques (Kordjazy et al, 2017; Kang et al, 2017). Cette inflammation est due à un déséquilibre du système immunitaire en réponse au changement de la flore intestinale, les macrophages et les neutrophiles sont en abondance dans l'intestin enflammé, ces cellules produisent des quantités excessives d'espèces réactives de l'oxygène (EROs), menant ainsi à une augmentation du stress oxydatif et une lésion de la muqueuse (Kang et al, 2017 ; Sairenji et al, 2017).

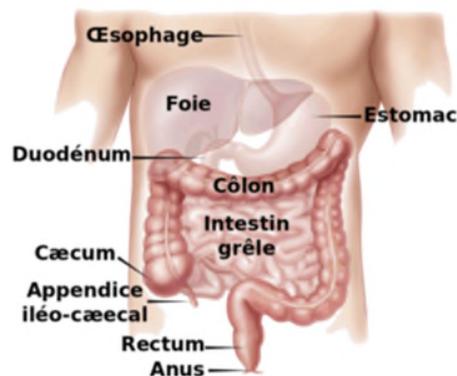


Figure 1 : Différents segments du tube digestif pouvant être atteint en cas de La recto-colite hémorragique et maladie de Crohn (<https://maladie-de-crohn.org>)

I-1.1 La maladie de Crohn

La maladie de Crohn se caractérise par une inflammation transmurale de l'intestin elle peut toucher n'importe quel segment du tube digestif, de la bouche jusqu'à l'anus. Le plus souvent, l'inflammation est cantonnée à la partie terminale de l'intestin grêle et du

côlon, ces phénotypes comprennent des fistules, des fissures, des abcès, des sténoses et des marques cutanées, ces dommages sont caractérisés par une surproduction du TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) qui est une cytokine inflammatoire produite par les cellules Th1 (T helper) et les macrophages impliquées dans les lésions tissulaires et la mort cellulaire dans la muqueuse intestinale des MICI. La maladie de Crohn se manifeste par des douleurs abdominale, fièvre, et diarrhée due a la diminution de l'absorption d'eau et de la sécrétion accrue d'électrolytes ou a la prolifération bactérienne de l'intestin grêle (Plevy, 2002; Zalieckas, 2017; Gajendran et *al*, 2017).

I-1.2 La recto-colite hémorragique (RCH)

La RCH se caractérise par des lésions qui se limitent au côlon et au rectum, c'est une atteinte superficielle de la muqueuse et de *lamina propria* (Ungaro et *al*, 2017). L'évolution de la maladie se manifeste par des phases de rémission entrecoupées d'exacerbation, dans le cas de cette maladie une réponse de type T auxiliaire 2 est prédominante (Ray et Sagar, 2017; Rasmussen et Hamaker, 2017; Eleftheriadis et *al*, 2007).

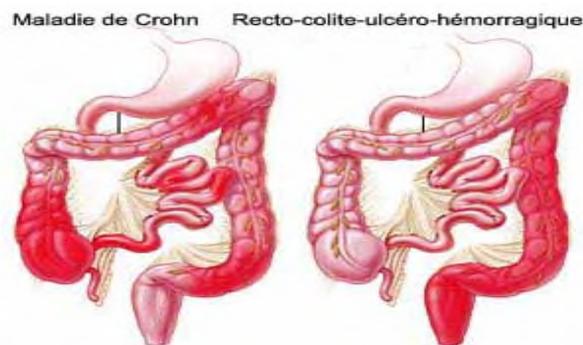


Figure 2 : Localisation des atteintes intestinales dans la maladie de Crohn et la RCH
D'après «The Johns Hopkins Medical Institutions. Gastroenterology &Hepatology Resource Center ».

I-1.3 Traitements des MICI

- **Les aminosalicylates**

Appelés également mésalazine, son métabolite acide 5-aminosalicylique (5-ASA) est facilement oxydé par le HOCl, un oxydant puissant généré dans l'inflammation de l'intestin. Ils peuvent être prescrits comme thérapie de première intention pour maintenir une rémission dans le cas de maladie légère à modérée chez les personnes souffrants de la

rectocolite hémorragique et de la maladie de Crohn (Kang et al, 2017; Ungaro et al, 2017).

Ils existent sous forme de formulation orale, de lavements ou de suppositoires, ils comprennent la sulfasalazine, la mésalamine orale, la mésalamine rectale, l'olsalazine et le balsalazide, ces médicaments inhibent les enzymes de la cyclo-oxygénase et de la lipoxygénase de la voie métabolique de l'acide arachidonique et diminuent ainsi la formation de prostaglandines et de leucotriènes pro-inflammatoires mais leurs mécanisme d'action précis est encore incertain (Ungaro et al, 2017 ; Gajendran et al, 2017).

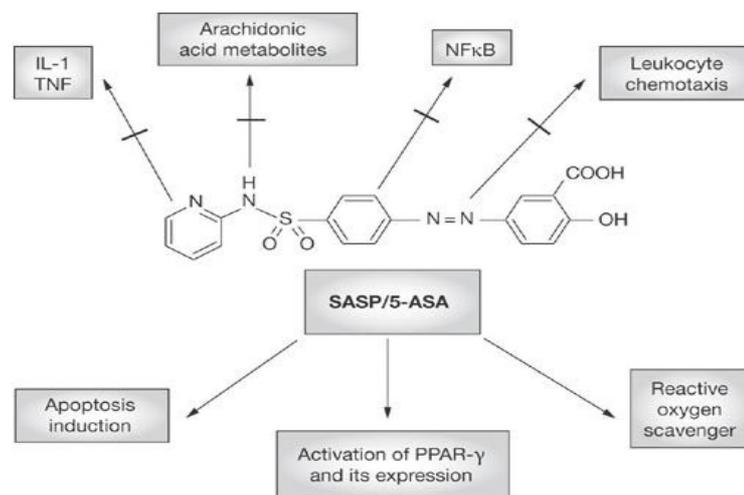


Figure 3 : Mécanisme d'action des Aminosalicylates (Nielsen et Munck, 2006).

- **Les corticostéroïdes**

Des essais ont démontrés la supériorité des corticostéroïdes pour la rémission des colites ulcéreuses et des maladies de Crohn, ils existent sous forme de comprimé par voie orale, sous forme de lavement ou de mousse rectale, et sous forme injectable, cette dernière a connu une chute impressionnante de la mortalité (Fasci-Spurio et al, 2017).

Les corticostéroïdes contrôlent la réponse inflammatoire, inhibent les molécules d'adhésion, induisent l'apoptose des lymphocytes activés et diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Le développement du budésonide n'est pas aussi efficace que les corticoïdes standard pour induire une rémission mais il est efficace pour traiter la maladie de Crohn, ils possèdent une faible biodisponibilité systémique par conséquent moins d'effets indésirables (Gajendran et al, 2017).

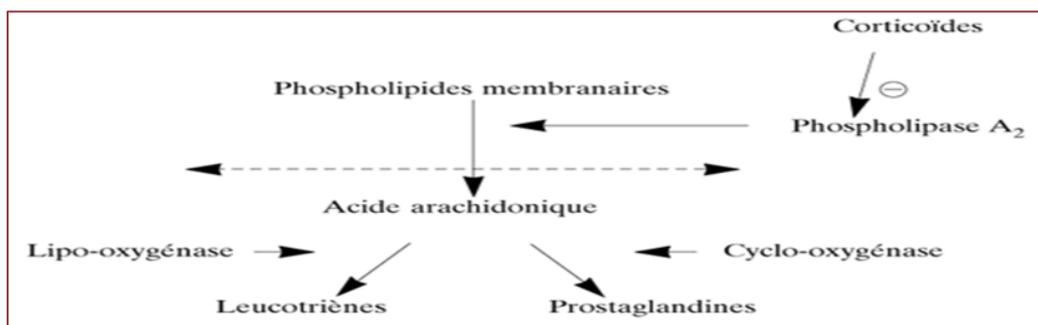


Figure 4 : Impact des corticoïdes dans la cascade arachidonique. En inactivant la phospholipase A₂, les corticoïdes inhibent toutes les voies à partir de l'acide arachidonique (Blanloeil et al, 1996).

- **L'immunothérapie (anti-TNF- α)**

Ce sont des Anticorps monoclonaux inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF), cette classe comprends l'infliximab, l'adalumimab et la certiluzimab, ces médicaments sont très efficaces dans l'induction et le maintient de la rémission. Des essais ont démontré que les anti-TNF- α sont efficaces dans 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, les anti-TNF- α sont donc le pilier des traitements actuel. L'infliximab est un élément clé du processus inflammatoire, administré par perfusion intraveineuse, sa liaison au TNF soluble empêche le déroulement de la cascade inflammatoire il peut également se lié au TNF membranaire provoquant ainsi l'apoptose (Samaan et al, 2014; Picco et Cangemi, 2009).

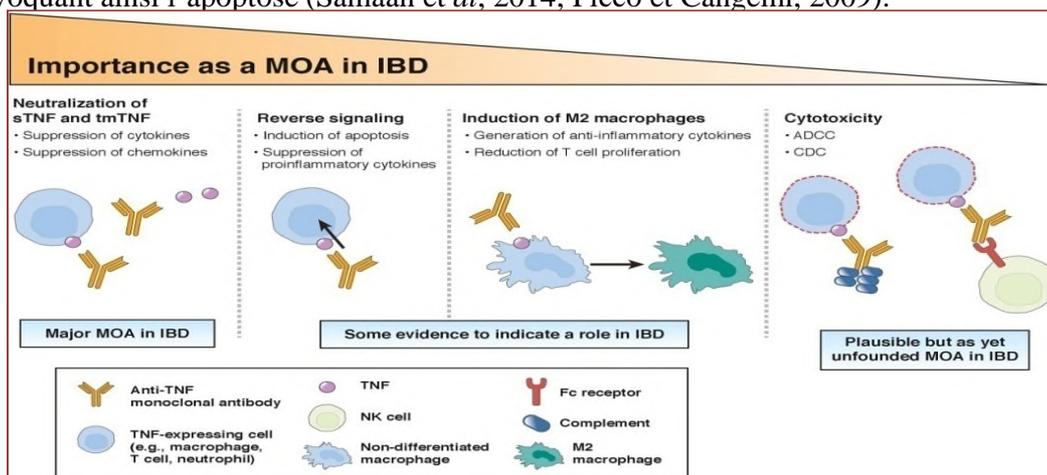


Figure 5 : Mécanismes d'action établis et possibles de l'infliximab et d'autres anticorps monoclonaux anti-TNF- α dans les MICI (Ben-Horin et al, 2016).

- **Les immunomodulateurs**

Le méthotrexate (MTX) "analogue de l'acide folique" et les thiopurines sont les plus utilisés dans la maladie de Crohn. L'azathioprine (AZA) et son métabolite le 6-mercaptopurine (6-MP), sont des traitements antimétabolites de la famille des thiopurines (analogues des purines). Après administration, l'AZA est transformé par voie non enzymatique en 6-mercaptopurine (6-MP). Le 6-MP est lui au carrefour de trois voies enzymatiques compétitives. Lorsqu'il est métabolisé par l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HGPRT), il est transformé en thioinosine monophosphate (TIMP) puis en thioguanine monophosphate (TGMP) aboutissant à la formation de métabolites actifs (6-TGNs) responsables de l'effet immunosuppresseur (effet thérapeutique) car c'est un antagoniste de la purine qui interfère avec la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Entrant en compétition avec la voie de l'HGPRT, celles de la xanthine oxydase (XO) et de la thioguanine méthyltransférase permettent la détoxification de 6-MP intracellulaire en acide 6-thiourique et 6-MMP respectivement (Guillotin et *al*, 2017).

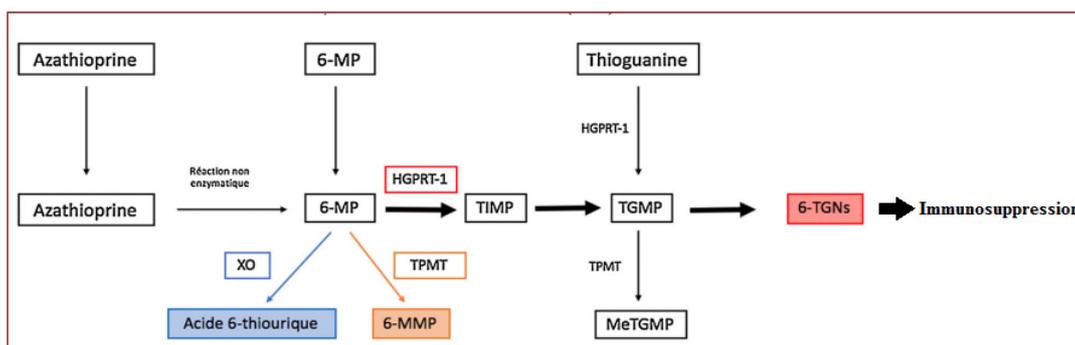


Figure 6 : Métabolisme de l'azathioprine après administration (Guillotin et *al*, 2017).

- **Les interventions chirurgicales**

Lorsque le traitement médicamenteux est inefficace ou dans le cas de complications, la chirurgie est nécessaire. Un risque de 33 à 34% de nécessité d'une intervention chirurgicale pour les personnes atteintes de la RCH, et entre 70% et 90% des patients atteints de la maladie de Crohn (Macken et Blaker, 2015; Lynch et *al*, 2016; Mekhjian et *al*, 1979).

- **Rétro colite-hémorragique (RCH)**

Pour la RCH, le traitement chirurgical consiste à l'ablation du gros intestin dans son intégralité « ablation totale » ou « colectomie totale », le rectum peut être laissé ou enlevé, mais pour prévenir la récurrence de la maladie et pour éliminer le risque de malignité rectale l'excision du rectum (proctectomie) est recommandée. Après ablation, la partie terminale de l'intestin grêle (l'iléon) est attachée soit au rectum (anastomose iléo-rectale) (Figure 6 (A)), soit à l'anus (si le rectum a été enlevé) on parle de anastomose iléo-pouchienne (IPAA) (Figure 6 (B)) (Ray et Sagar, 2017).

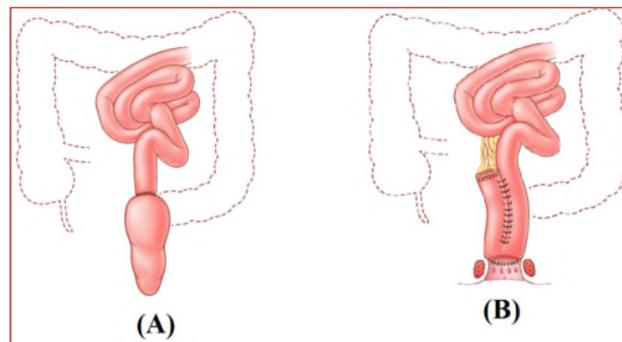


Figure 7: Anastomose iléo-rectale (A) et anastomose iléo-pouchienne (B) (Ray et Sagar, 2017).

- **Maladie de Crohn**

La maladie de Crohn peut atteindre, de façon plus ou moins étendue, tous les segments du tube digestif dont les trois sites classiques d'atteinte de la maladie sont l'iléon, l'iléocolique et la colite de Crohn. Le traitement chirurgical est donc plus problématique (Ray et Sagar, 2017). Les lésions sont traitées par la résection de la partie atteinte pour limiter la longueur des segments intestinaux enlevés. Cela est fondamentalement au niveau de l'intestin grêle, les deux extrémités de l'intestin sain sont alors anastomosé (Victor et al, 1996). Au niveau du côlon, la résection peut être plus étendue comme dans le cas de la RCH, sans conséquence majeure.

I-2 Généralités sur les linacées

Les linacées, sont une famille de plantes dicotylédones, présente plus de 200 espèces de lin, dont la plus répandue et la plus cultivée est *Linum usitatissimum* (Bolsheva et al, 2015). Le nom *Linum* vient du mot celtique lin ou "fil", et le nom *usitatissimum* est latin "plus utile", ou " lin de tout les usages " (Muir et Neil, 2013), en anglais appelée Flaxseed, en arabe zariaat el ketan.

Linum usitatissimum est une plante herbacée annuelle, bisannuelle ou vivace, elle est constituée d'une tige unique et d'une racine pivotante, qui se ramifie en racelles fibreuses pouvant atteindre 9 à 12 cm et ses fleurs bleu vif ont jusqu'à 3 cm de diamètre (Pradhan et al, 2010). Les capsules de fruits sphériques contiennent deux graines dans chacun des cinq compartiments (Ganorkar et Jain, 2013). Elle possède une surface lisse et brillante. Sa couleur varie du brun foncé au jaune (Freeman, 1995). La texture de la graine de lin est croquante et moelleuse possédant un goût agréable de noisette (Carter, 1996).

Presque toutes les parties de la plante sont utilisées à diverses fins, La tige donne des fibres de bonne qualité possédant une résistance et une durabilité élevées, tandis que la graine est riche en composés utilisés en médecine traditionnelle et comme produits nutritionnels (Gutte, et al 2015).

I-2.1 La graine de lin

La graine de lin englobe de nombreux composés et 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). La plupart des études biologiques et cliniques sur les graines de lin ont porté sur des extraits contenant de l'acide α -linoléique (ALA) ou des lignanes, d'autres composés de lin ont reçu moins d'attention et leur activité n'est pas bien décrite (Shim et al, 2014). La composition des graines de lin est en moyenne de 30-40% de matières grasses, de 20-25% de protéines, de 20-28% de fibres alimentaires totales, de 4-8% d'eau et de 3-4% de cendres, et l'huile contient des vitamines A, B, D et E, minéraux (Bhatt, 1997).

Tableau I : Composition chimique (%) des grains de lin (Rubilar *et al*, 2010).

Eau	Protéine	Lipide	Fibre	Cendre	Références
7,4	23,4	45,2	-	3,5	Mueller <i>et al.</i> (2010)
4-8	20-25	30-40	20-25	3-4	Coskuner et Karababa (2007)

La graine de lin est 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).

I-3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances d'origine naturelle, plus souvent végétale, rarement animale ou bactérienne, rappelant les alcalis, en réagissant comme des bases. Alcalis tire son origine de *al kaly* (en arabe), et du grec *eidōs* qui signifie respectivement soude et aspect (Bruneton, 2009). Ce sont des substances azotées douées d'intérêts pharmaceutiques, ils possèdent une structure complexe de noyau hétérocyclique ayant un atome d'azote à l'intérieur du cycle qui possède une activité pharmacologique significative (Gupta *et al*, 2015). Sont principalement présents chez les angiospermes dicotylédones, ils sont localisés dans les tissus périphériques tels que les tiges, les racines et les téguments des graines (Bruneton J, 1999).

Le premier alcaloïde extrait est la morphine qui est isolée à partir de l'opium par Derosne en 1803, puis la strychnine extraite de la noix vomique en 1818, puis la caféine (graines et feuilles de caféier 1819) (Moreau, 1964; Bruneton, 1999).

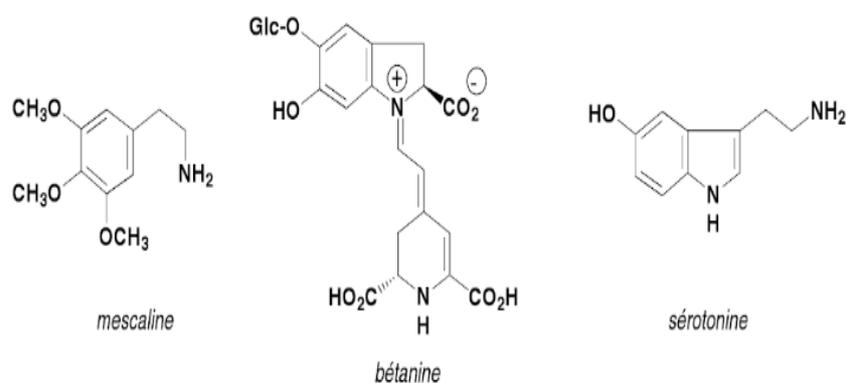


Figure 8: Structure moléculaire de quelques alcaloïdes (Bruneton, 2009).

I-3.1 Classification des alcaloïdes

A ce jour, il y'a plus de 15 000 alcaloïdes différents qui ont été extraits et isolés, la définition étant déjà difficile, la classification de ceux-ci n'est pas plus simple. Les alcaloïdes peuvent être classés selon la présence ou non d'un précurseur de synthèse (acide aminé) et l'inclusion ou non d'un atome d'azote dans un système hétérocyclique (Gupta et *al*, 2015; Bruneton, 2009). On distingue 3 classes majeures des alcaloïdes (Alcaloïdes vrais, Proto-alcaloïdes, pseudo-alcaloïdes) (Milcent et chau, 2003).

- **Alcaloïdes vrais :** les plus répandus, sont caractérisés par la présence d'un atome d'azote contenu dans un hétérocycle, et leur biosynthèse s'effectue à partir d'acides aminés, sont toxiques, et ils existent à l'état de sels (Milcent et Chau, 2003; Bruneton, 2009).
- **Les proto-alcaloïdes :** sont des amines simples, l'atome d'azote ne faisant pas partie d'un hétérocycle, ils dérivent d'acides aminés, sont solubles dans l'eau (Bruneton, 2009).
- **Les pseudo-alcaloïdes :** la plus part sont basiques, ils ne dérivent pas d'acides aminées (Bruneton, 2009).

I-3.2 Caractérisation des alcaloïdes

Dans un milieu aqueux légèrement acide, la précipitation des alcaloïdes sous l'action de certains réactifs appelés (les réactifs généraux des alcaloïdes), permet la caractérisation chimique des alcaloïdes (Bruneton, 1999). La réaction est basée sur la

capacité des alcaloïdes à se combiner aux métaux lourds tels l'iode-ioduré (réactif de *Bouchardat*) qui donne un précipité brun, tétra-iodomercurate de potassium (réactif de *Valsler-Meyer*) donne un précipité blanc jaunâtre, et le tétra-iodobismuthate de potassium (réactif de *Dragendorff*) donne un précipité rouge orangé. Ils existent aussi des réactifs qui donnent dans des solutions très concentrés en alcaloïdes des précipités cristallins, qui se caractérisent au microscope (chlorure d'or, de platine, acides picriques...) (Bézanger-Beauquesne, 2014).

I-3.3 Propriétés physico-chimiques

La masse molaire des alcaloïdes varie de 100 à 900 g/ml. Leur saveur est amère, ils ont un caractère basique et leur basicité dépend du doublet de l'azote (Robinson, 2000), a température ambiante les alcaloïdes non oxygénés sont liquides, volatils, entraînés à la vapeur d'eau; contrairement aux alcaloïdes oxygénés qui sont solides et cristallisables (sels) et généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués, et insolubles dans les solvants organiques apolaires (Bruneton, 2009).

I-3.4 Actions pharmacologiques

Les alcaloïdes sont des composés du métabolisme secondaire dans les plantes et jouent un rôle de défense contre les herbivores, cependant ils provoquent de diverses réponses physiologiques chez l'homme; ils agissent à faibles doses et peuvent présenter une forte toxicité même si a des doses très faibles (aconitine) (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, anti-dépressives et anti-oxydantes (Khan, 2007; Khan et al, 2017). Ils ont une action sur le système nerveux central et le système nerveux autonome par leurs capacité 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).

II- Matériel et méthodes

Le principal objectif de notre étude consiste à connaître la valeur pharmacologique de *Linum usitatissimum* en testant l'effet anti-inflammatoire de leurs alcaloïdes sur l'inflammation intestinale, cette recherche a été effectuée au sein du laboratoire de biologie moléculaire de la FSNV de l'université de Bejaia.

II-1 Matériel

II-1.1 Matériel végétal

L'expérience a été réalisée sur les graines de *Linum usitatissimum* (figure 9), appelée localement «Zaria'at el ketan», achetée chez un herboriste et identifiée au niveau du laboratoire de BVEB.

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



Figure 9: Graines de lin (Bejaia, 2018)

II-1.2 Matériel animal et conditions d'élevage

On a utilisé des souris males et femelles albinos (poids 26-32g) de souche NMRI (Figure 10), de l'Animalerie de la faculté SNV. Pour l'évaluation de la toxicité aigue et l'étude de l'activité anti-inflammatoire intestinale des alcaloïdes de *Linum usitatissimum*. Les souris ont été logées à une température constante de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ et d'humidité de 60-70%, avec un cycle de lumière/obscurité de 12h, elles sont marquées deux fois par semaine afin de préserver leur identité dans chaque lot, et répartit en 6 souris par cage, munit d'une mangeoire d'aliment (ONAB «El Kseur, bejaia»), et d'un biberon rempli d'eau.



Figure 10: Photographie de souris albinos de souche NMRI (FSNV, Université de Bejaia).

II-2 Méthodes

II-2.1Extraction des alcaloïdes

Les graines de lin ont été lavées et débarrassés de résidus, puis broyées grâce à un broyeur électrique et enfin tamisées à un diamètre de $45\mu\text{m}$ pour avoir une poudre homogène qui était de 150g. Afin d'effectuer l'extraction des alcaloïdes des graines de lin nous avons suivi le protocole de (soušek *et al*, 1999), qui s'agit d'une extraction solide-liquide (figure11).

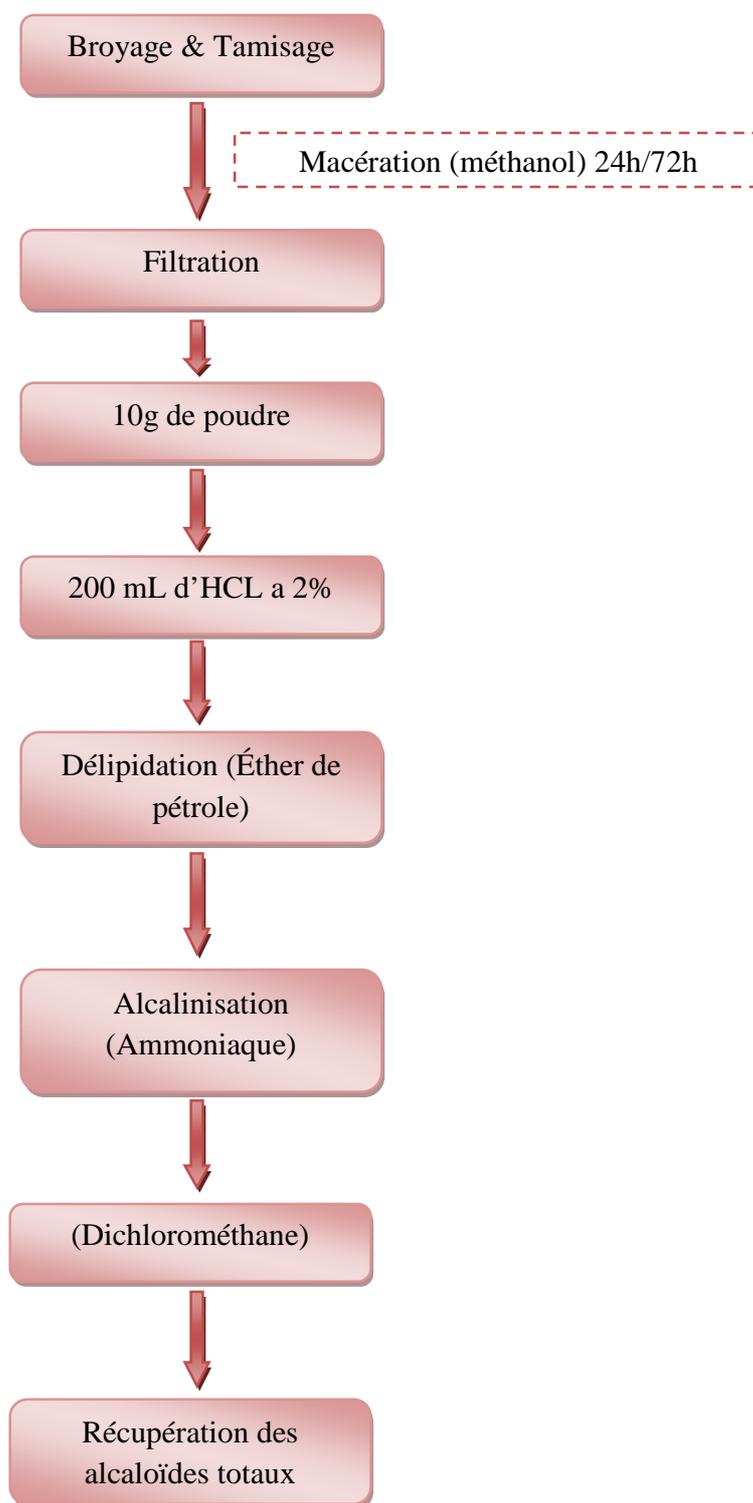


Figure 11: Protocole d'extraction des alcaloïdes a partie des grains de lin (soušek *et al*, 1999).

II-2.2 Évaluation de la toxicité aiguë

Afin d'évaluer la toxicité aiguë de *Linum usitatissimum*, les souris ont été réparties en 4 lots (8 souris/lot). Le lot control n'a reçu que l'eau distillée, les trois autres lots ont reçu respectivement des doses croissantes de l'extrait alcaloïdique à raison de 50, 500 et 2000 mg/kg. L'observation a été effectuée pendant 24 à 72h afin de déterminer la dose ayant provoqué 50% de morts (DL50), on notera ainsi le comportement des animaux au cours de l'expérience.

II-2.3 Étude de l'activité anti-inflammatoire intestinale

L'inflammation colique a été provoquée par l'acide acétique selon le Protocole de Wang et ses collaborateurs (2008) (Figure 11(A)). Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* on a opté pour deux protocoles expérimentaux sur des souris qu'on a laissées à jeun 16h avant l'expérience, le 1^{er} test aiguë s'étend sur une durée de 48h, le 2^{ème} test subaiguë de 5 jours, nous avons également traité un lot de souris par un médicament de référence qui est le Dexaméthasone afin de comparer avec les deux tests

- **Test aiguë (48h)**

Vingt quatre (24) souris ont été séparées en 4 lots avec un nombre homogène dans chacun (6 souris), le lot témoin négatif a reçu seulement l'eau distillée par la méthode du gavage (Figure 11 (B)). Les 3 autres lots ont reçu une dilution d'acide acétique à 5%, en administrant 100 µl de la solution par voie rectale (Figure 11 (A)), dont 2 lots ont été traités par une solution d'alcaloïdes de doses différentes (12.5 et 50mg/kg) pendant 48h, le 3^{ème} lot a servi de témoin malade.

- **Test subaiguë (5 jour)**

Vingt quatre (24) souris ont été réparties en 4 lots avec un nombre homogène dans chacun (6 souris). Un lot a été traité par l'eau distillée qui a servi de control (témoin non malade), 100 µl de solution d'acide acétique à 5% a été administrée pour les 3 autres lots, parmi lesquels 2 ont reçu des doses (12.5 et 50 mg/kg) de la solution d'alcaloïdes une fois par jour pendant 5 jours, et le dernier servira de témoin malade.

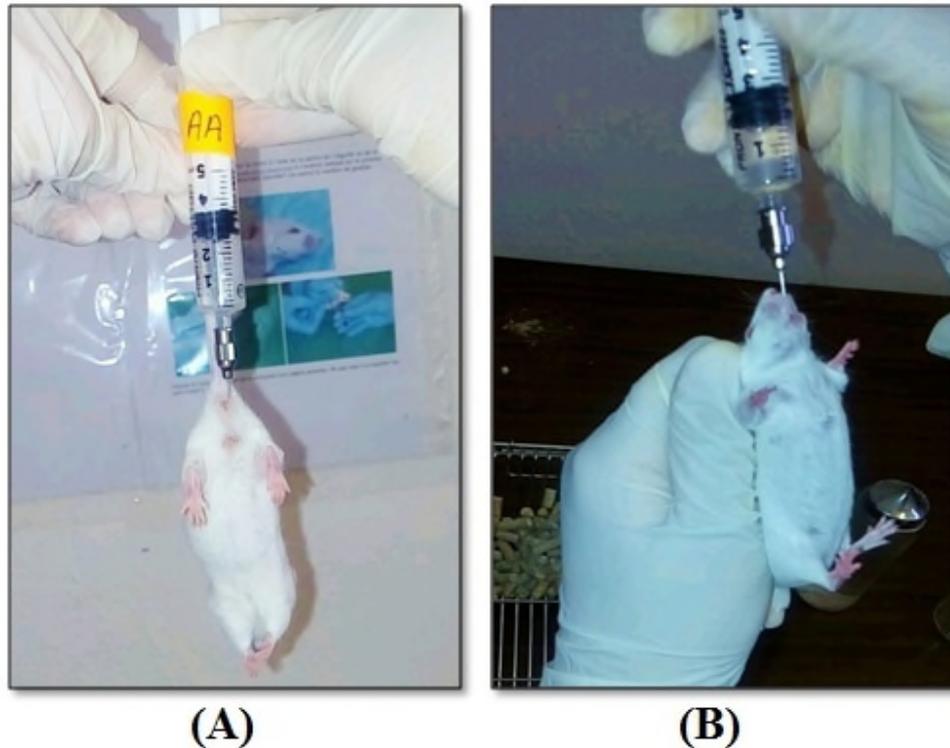


Figure 12: Administration de l'acide acétique par voie rectale (A), et l'administration des alcaloïdes des graines de lin par gavage (B).

- **Évaluation des dommages macroscopiques**

Le changement du poids corporel, la consistance des selles et les saignements ont été observés et notés durant la période d'expérience. Les souris ont été anesthésiées pour faciliter les sacrifices par dislocation cervicale, puis disséquées ouvert pour enlever les côlons, et les nettoyer de la graisse et de méésentère. Le côlon a été ouvert longitudinalement le long de la ligne méésentrique pour évaluer les dommages causés par l'acide acétique ainsi l'effet anti-inflammatoire des alcaloïdes de *Linum usitatissimum*. Ensuite, 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).

II-2.4 Étude statistique

La présentation des données est faite par Graph pad comme moyenne \pm SEM. Pour comparer les résultats des lots traités aux résultats des lots témoins, des analyses ont été effectuées grâce au test ANOVA suivant le test de *Dunnnett's*, avec des significations statistiques de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ utilisant un effectif de $n=6$.

III-1 Résultats

III-1.1 Extraction des alcaloïdes totaux de *Linum usitassimum*

L'extraction des alcaloïdes totaux de *Linum usitassimum* par la méthode solide-liquide par macération en utilisant le méthanol comme solvant, nous a permis d'obtenir un extrait jaunâtre avec un rendement de 0.7%.

III-1.2 Étude de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë des alcaloïdes de *Linum usitassimum* était évaluée sur des souris NMRI répartis en 4 groupes (8 souris dans chaque lot). Aucun signe de toxicité comme les changements de comportement et de mortalité n'a été observé pour les doses (50 et 500 mg/Kg), et deux décès ont été notés dans le lot de souris qui ont reçu la dose 2000 mg/Kg après quelques heures d'administration (Tableau II). Le poids corporel hebdomadaire des souris n'a indiqué aucune différence significative entre les 3 groupes traités par les alcaloïdes par rapport au groupe témoin. Pendant les 4 jours de l'expérience; une augmentation normal du poids a été observé (Figure13), cela signifie que les alcaloïdes de *Linum usitassimum* ne provoque pas une perte d'appétit. L'apparence physique (yeux, fourrure et peau) s'est avérée normal (Tableau III). D'après ces résultats la DL 50 de la fraction des alcaloïdes de *Linum usitassimum* est supérieur à 2000 mg/kg.

Tableau II : Taux de létalité chez les souris NMRI traités par la fraction d'alcaloïdes de *Linum usitassimum*

Doses (mg/kg)	Mortalité	Latence de mortalité
0 mg/kg	0/8	0
100 mg/kg	0/8	0
200 mg/kg	0/8	0
2000 mg/kg	2/8	0

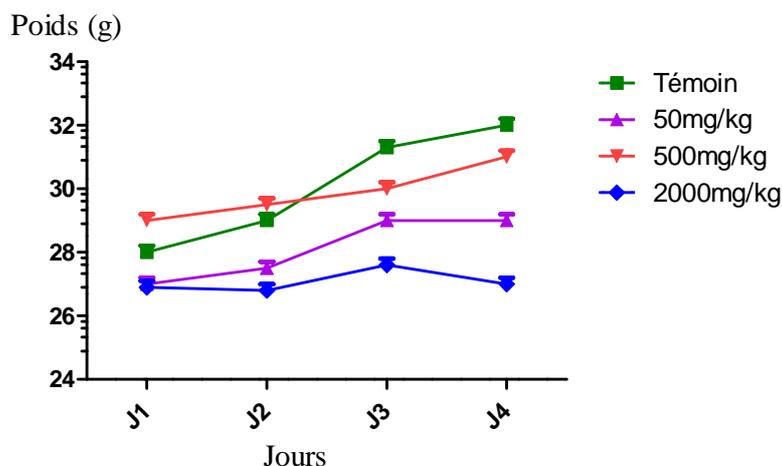


Figure 13 : Effet des alcaloïdes de *Linum usitassimum* (50, 500 et 2000 mg/kg) sur la variation du poids des souris pendant 4 jours

Tableau III : Évaluation des comportements et symptômes des souris pendant l'étude de la toxicité aiguë

	Lot témoin	100mg/kg	200mg/kg	2000mg/kg
Tremblements	/	/	/	/
Peau et Fourrure	/	/	/	/
Diarrhée	-	-	-	-
Saignement	/	/	/	/

III-1.3 Étude de l'activité anti-inflammatoire intestinale

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet anti-inflammatoire intestinal des alcaloïdes de *Linum usitassimum* sur un modèle de colite induite par l'acide acétique chez des souris NMRI.

III-1.3.1 Activité anti-inflammatoire (test de 48h)

Une amélioration de la longueur des colons des lots traités a été notée par rapport au lot acide acétique (Figure 14). Une réduction significative des rapports P/L a été constatée pour les lots traités avec les deux doses (12.5 et 50 mg/Kg) d'alcaloïdes de

Linum usitatissimum, en comparaison avec le lot d'acide acétique. Le groupe malade (acide acétique) présente le plus grand rapport P/L par rapport au groupe témoin et aux groupes traités avec les doses 12.5 mg/Kg et 50 mg/kg comme le montre le (Tableau V). Une réduction de 30,31% et 21,34% pour les deux lots (12.5 et 50 mg/kg) d'alcaloïdes de *Linum usitatissimum* respectivement a été notée a des niveaux similaires aux groupe contrôle et celui traité par le DEX, qui réduit l'inflammation colique par rapport au lot acide acétique (figure 15). La différence entre le lot malade et les deux lots traités est hautement significative ($p < 0,001$) la dose de 12.5 mg/kg donne un meilleur effet que la dose de 50 mg/kg, ce qui implique une possibilité de guérison de la maladie inflammatoire intestinale.

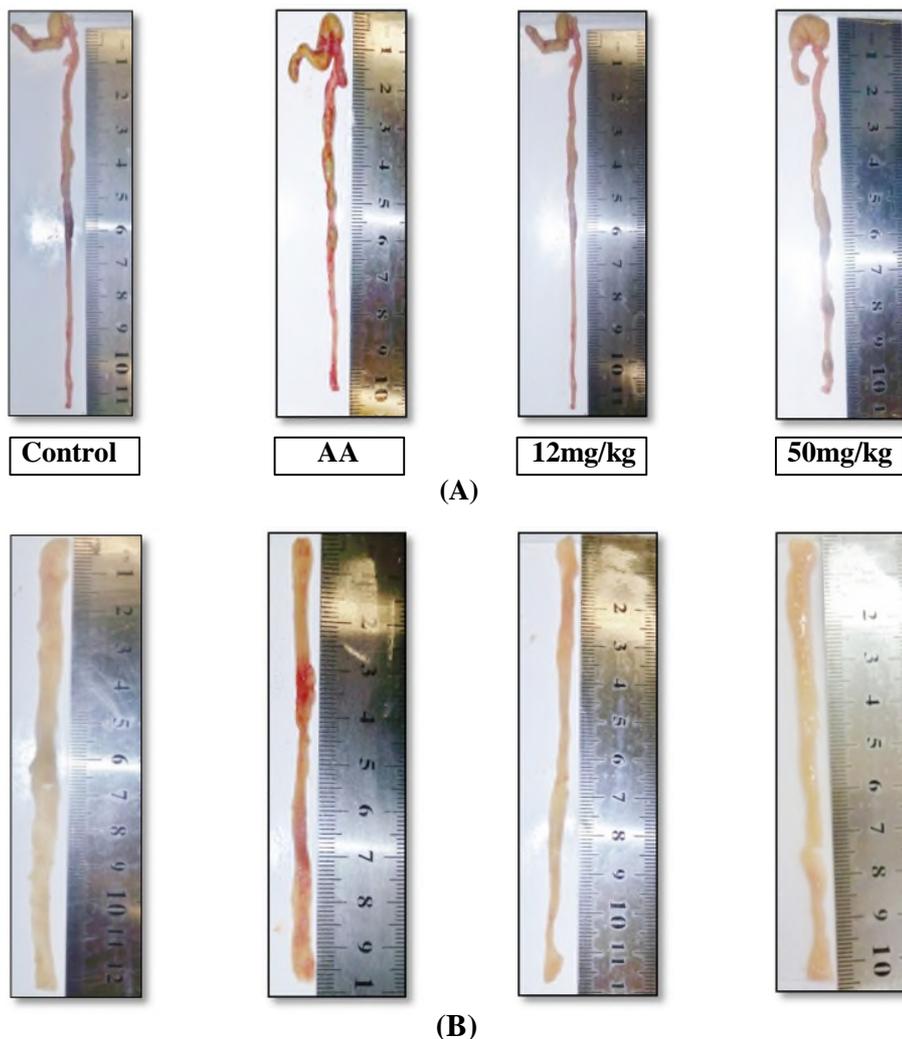


Figure 14 : Morphologie et longueur des colons des différents lots (A), et l'aspect de l'inflammation intestinale du colon des souris acide acétique par rapport au control (B).

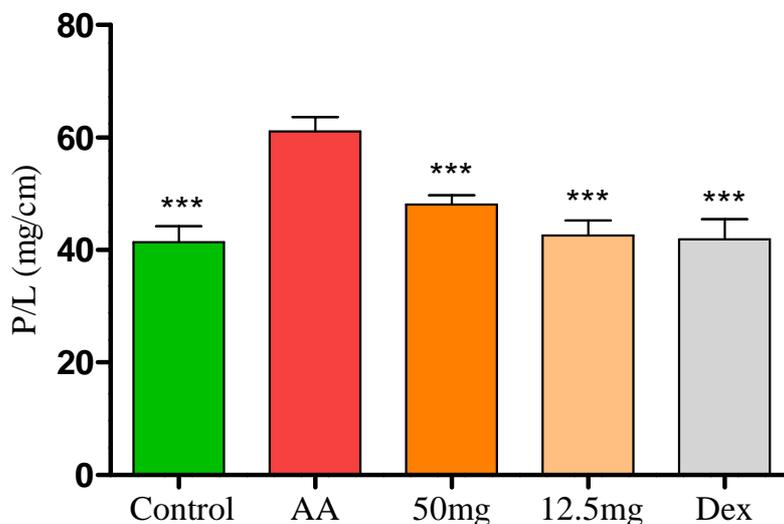
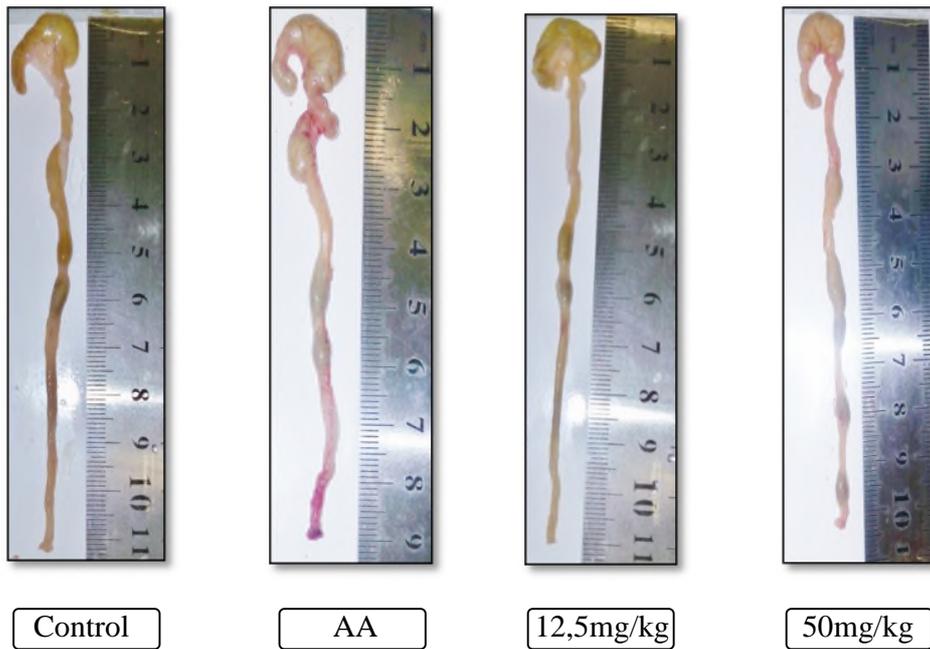


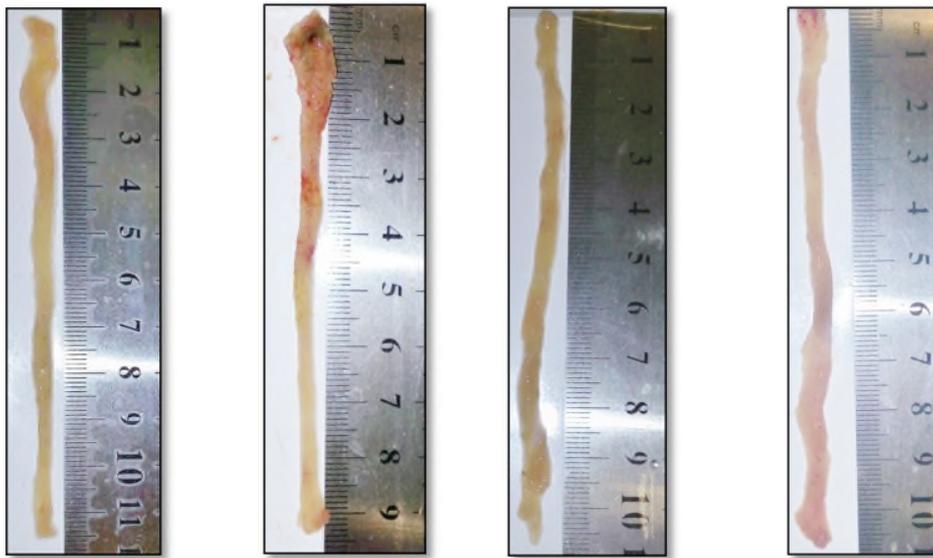
Figure 15: Effets des alcaloïdes de *Linum usitassimum* (12,5 et 50 mg/kg) sur l'évolution du rapport P/L en mg/cm dans un model de souris colitique induite par l'acide acétique a 5%. Les données sont exprimées en moyen \pm SEM (n=6). (***) $P < 0.001$. (* $P < 0.05$ est considéré comme significatif). AA : acide acétique); DEX : Dexamethasone; L : longueur; P : poids.

III-3.1.2 Activité anti-inflammatoire (test de 5 jours)

L'administration des deux doses d'alcaloïdes de *Linum usitassimum* (12.5 et 50 mg/Kg) a montré une amélioration générale de l'état clinique des souris traitées, notamment une réduction significative du poids des colons ainsi que l'amélioration de la longueur de ces derniers, par rapport au lot malade ayant reçu l'acide acétique (Figure 16). Aucune diminution du poids des souris n'a été remarquée pendant les 1^{ers} quatre jours du test pour les lots traités par rapport au lot malade (acide acétique) (figure17).



(A)



(B)

Figure 16: Morphologie et longueur des colons des différents lots (A), et l'aspect de l'inflammation intestinale du colon des souris acide acétique par rapport au control (B)

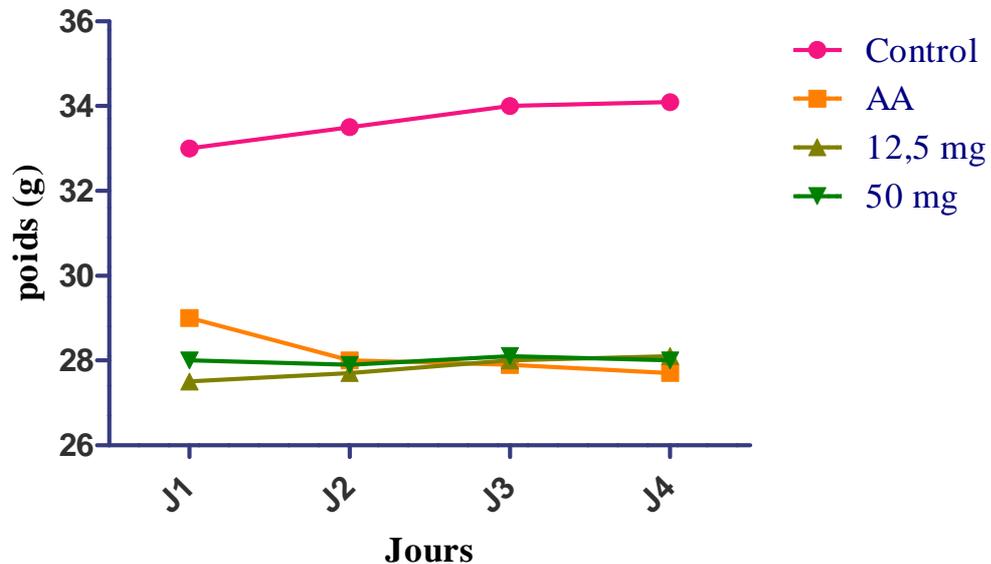


Figure 17: Effet des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* (12,5 et 50 mg/kg) sur la variation du poids corporel des souris pendant 4 jours. AA : acide acétique

La première chose dans l'inspection macroscopique évaluée était le rapport poids/longueur (P/L) qui est considérée comme l'indicateur de la gravité de l'inflammation intestinale (Sotnikova *et al*, 2013), ainsi que les atteintes observées au niveau des parois de ces derniers lors de leur récupération après sacrifice.

Il est évident que le groupe acide acétique avait un plus grand rapport moyen P/L du côlon comparé au groupe témoin, les doses 12.5 mg/kg et 50 mg/Kg ont un rapport P/L plus faible par rapport au groupe acide acétique et la différence est significative ($p < 0.05$) indiquant une possibilité de diminution du processus inflammatoire (Figure 20).

Une réduction significative des poids des colons et l'amélioration de ces derniers a été remarquée après le traitement avec les doses de 12.5 et 50mg/kg ainsi par dexaméthasone (2.5 mg/kg), avec une diminution de 31,42 % du rapport P/L par rapport au groupe traités par l'acide acétique.

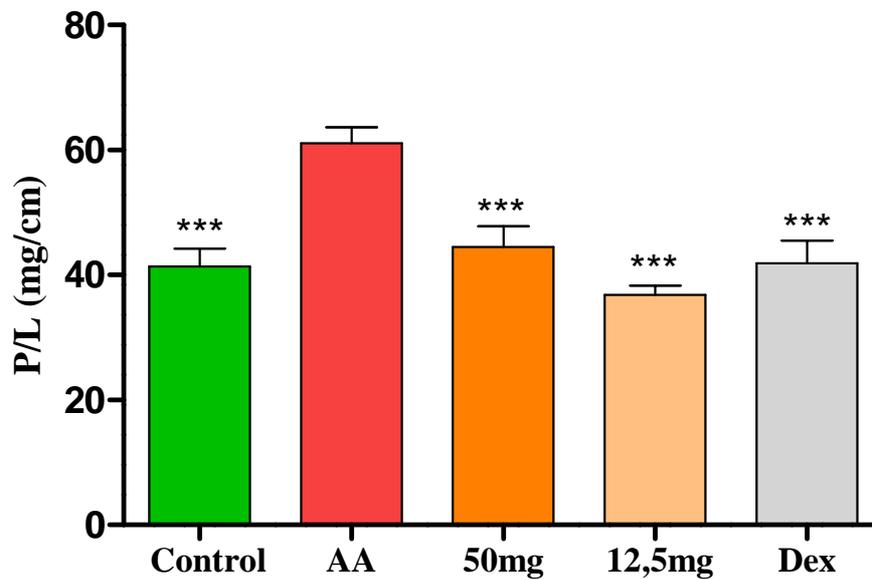


Figure 18: Effets de la fraction des alcaloïdes totaux (AGL) (12.5, et 50 mg/kg) sur l'évolution du rapport P/L en mg/cm dans un model de souris colitique induite par l'acide acétique a 5%. Les données sont exprimées en moyen \pm SEM (n=6). (***) $P < 0,001$ (* $P < 0.05$ est considéré comme significatif). AA : acide acétique; DEX : Dexamethasone; L : longueurs; P : poids.

III-2 Discussion

Les signes et symptômes de l'inflammation sont : la rougeur, la chaleur, le gonflement et la douleur. L'inflammation se traduit par une succession d'événements dont : une vasodilatation permettant un flot sanguin massif vers le site inflammatoire ce qui est responsable de la chaleur et de la rougeur, l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire, une augmentation de la perméabilité des capillaires permettant aux macromolécules de s'épancher entraînant la douleur, progression des leucocytes vers le foyer inflammatoire par diapédèse. Une fois arrivée au site de l'inflammation les cellules phagocytaires sont activées, et produisent massivement des médiateurs pro-inflammatoires permettant le recrutement cellulaire (Marta et al, 2017).

Dans notre étude la colite a été induite par 5% d'acide acétique, plusieurs études ont révélé que ce traitement provoque des lésions tissulaires importantes (Cagin, 2016); ce qui explique les dommages qu'on a observé au niveau de la paroi des colons. Le côlon contient deux couches de mucus, où la couche externe sert d'habitat et de source nutritionnelle pour le microbiote intestinal commensale et la couche interne est composée de mucines (Muc-2) attachées à l'épithélium qui assure l'absence de bactéries dans cette région (Johansson et al, 2008). Les cellules épithéliales forment une monocouche de cellules polarisées reposant sur la *lamina propria* via leur pôle basolatéral et étroitement liées entre elles par des jonctions serrées composées de claudines, d'occludines, de *zonula-occludens* et de molécules d'adhésion jonctionnelles qui crée un joint entre les cellules épithéliales intestinales voisines et régulent la perméabilité aux ions, aux nutriments et à l'eau tout en évitant l'entrée des microbes entre les cellules (Andreu et al, 2006; Ramanan et Cadwell, 2016). Une augmentation du nombre de bactéries associées aux muqueuses est positivement corrélée avec l'activité des MICI, en altérant la fonction de la barrière et l'appauvrissement du mucus (Sina et al, 2018). La perméabilité paracellulaire de la barrière épithéliale intestinale est très élevée, grâce à la dilatation des jonctions serrées (Sharma et al, 2018). Il est connu que la destruction de cette barrière est un événement initial dans l'apparition des MICI. Le modèle acide acétique de la colite décrit les mêmes symptômes de la RCH; en provoquant une réduction des cellules caliciformes sécrétant la mucine, compromettant ainsi la perméabilité colique et

favorisant la translocation bactérienne via l'épithélium intestinale. La lésion physique de l'épithélium colique provoque une entrée d'acide sous forme protonée soluble conduisant à une acidification intracellulaire extensive qui active éventuellement les monocytes et les macrophages ainsi que l'infiltration des neutrophiles (Palla et al, 2016).

Nos résultats démontrent que les alcaloïdes de *Linum usitassimum* réduisent la gravité de la lésion aiguë des côlons induite par l'acide acétique (5%) et atténuent les caractéristiques de l'inflammation, y compris la forme, les dommages macroscopiques ainsi que le rapport P/L des colons. Ce qui était remarqué dans les deux tests de 48h et de 5 jours avec les deux doses utilisées dans notre étude (12,5 et 50 mg/kg). La dose 12,5 mg/kg avait plus d'effet sur le rapport P/L que la dose 50 mg/kg, prouvant ainsi que les alcaloïdes de *Linum usitassimum* agissent à faibles doses. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Palla et ses collaborateurs, d'où l'administration de la dose 300 mg/kg avait plus d'effet que la dose 500 mg/kg. Les alcaloïdes de *Linum usitassimum* augmentent significativement la présence des cellules caliciformes et réduisent l'infiltration des neutrophiles, c'est pour cela qu'on constate une baisse de gonflement et une extension des colons chez les groupes traités (Palla et al, 2016).

Les médiateurs inflammatoires produits au cours de la colite sont les prostaglandines synthétisées en présence de COX-2 et les cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1, IL-6, TNF- α et l'INF- γ , qui induisent en outre la libération de chimiokines recrutant des neutrophiles qui provoquent une stimulation immunitaire (IL-17 et IL-10) et libèrent des oxydants cytotoxiques puissants (le monoxyde nitrique «NO») qui amplifient davantage la chimiotaxie. Cela provoque par la suite une prédominance des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sur les antioxydants (CAT, SOD, GSH et GPx), ce qui entraîne une peroxydation lipidique.

La production précoce de TNF- α est prédominante dans l'initiation ultérieure d'une cascade biologique hautement complexe impliquant des chimiokines, des cytokines et des adhérences endothéliales qui recrutent et activent les cellules immunitaires intestinales sur les sites d'atteinte et d'infection. L'étude de Palla et ses collaborateurs a démontré que chez le modèle malade, le niveau d'INF- γ était environ 5 fois plus élevé que le TNF- α . Il est peu probable que l'INF- γ libéré par les neutrophiles soit dû à des signaux provenant de

cellules dendritiques. L'IL-17 est une autre cytokine importante impliquée dans la pathogenèse immunitaire innée chez la souris, les niveaux d'IL-17 sont significativement plus élevés chez le groupe acide acétique. Le NO joue des rôles importants mais ambivalents dans les MICI, il induit des cassures d'ADN menant à des effets apoptotiques, comme il peut protéger la muqueuse. En effet, dans différents modèles de colite, l'inhibition du NO a augmenté la lésion tissulaire, alors que, dans d'autres modèles, l'inhibition du NO a été bénéfique (Stettner et al, 2018). Au niveau intestinale le NO est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine par une enzyme appelé oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Kolios et al, 2004).

La caractérisation de la composition chimique de *Linum usitassimum* a démontré la présence d'alcaloïdes, deux composants ont été identifiés, l'acide nicotinique et le nicotinamide. Des études ex vivo indiquent que Les alcaloïdes de *Linum usitassimum* possèdent une activité inhibitrice des récepteurs PDE-4 présents sur les monocytes et ont montré une inhibition du TNF- α . *Linum usitassimum* a également montré l'inhibition du NO via iNOS par la régulation négative de l'IFN- γ et TNF- α dans le modèle de la colite. Les alcaloïdes ont donc inhibé le TNF- α . D'autre part, les souris pré-traitées ont montré des niveaux significativement faibles d'IFN- γ dans les homogénats de tissu du côlon et cela est dû à la suppression de la voie médiée par les cellules dendritiques. L'effet inhibiteur sur TNF- α et IFN- γ a une implication très importante puisque la neutralisation de ces deux produits a produit un effet additif chez les souris colites induites par l'acide acétique (Palla et al, 2016).

Conclusion

Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés particulièrement bénéfiques pour la santé humaine. La découverte progressive des principes actifs permet l'apparition de nouveaux médicaments de synthèse et la compréhension des métabolites secondaires des plantes tels les alcaloïdes qui sont largement utilisés en thérapeutique comme analgésique; antiparasitaires; anticancéreux et anti-inflammatoires.

Cette étude s'est intéressée aux alcaloïdes de *Linum usitatissimum* car ils exercent un effet anti-inflammatoire intestinale sur la rétro-colite hémorragique expérimentale induite par l'acide acétique à 5% chez des souris NMRI, qui ressemble à une colite humaine.

L'effet anti-inflammatoire a été confirmé par la diminution du rapport P/L des colons ainsi que l'amélioration de leur paroi, notre étude sur la toxicité de *Linum usitatissimum* a montré qu'elle est non toxique même à une dose de 2000mg/kg.

Cette étude met en évidence que la fraction d'alcaloïdes des graines de lin améliore la sévérité du modèle de colite induite par l'acide acétique à 5% chez les souris albinos de souche NMRI, en réduisant les niveaux d'IFN- γ , TNF- α et augmentant le niveau d'IL-17, avec des activités antioxydantes et anti-inflammatoires simultanées qui entraînent des effets protecteurs de la muqueuse. Par conséquent, en ciblant de multiples aspects de la maladie, la graine de lin a le potentiel de cibler plusieurs principes de la MICI.

- Ajai, P. G., Pankaj, P., Manoj, K., Saima, Kh., Rajni, S., Suphla, G. (2015).** A Source of Anticancer Agents from Nature. *Alkaloids*, **46**, 341-445.
- Allman, M. A., Pena, M. M., Pang, D. (1995).** Supplementation with flaxseed oil versus sunflowerseed oil in healthy young men consuming a low fat diet: effects on platelet composition and function. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **49**, 169–178.
- Ávila-Román, J. (2017).** Microalgae-derived oxylipins decrease inflammatory mediators by regulating the subcellular location of NFB and PPAR. *Pharmacol Res.*
- Ben-Horin, S., Castele, N. V., Schreiber, S., Lakatos, P. L. (2016).** Biosimilars in Inflammatory Bowel Disease: Facts and Fears of Extrapolation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **14**, 1685-1696.
- Bézanger-Beauquesne, L. (2014).** Les alcaloïdes dans les plantes. *Bulletin de la Société Botanique de France*, **105**, 266-291.
- Bhatty, R. S. (1997).** Nutrient composition of whole flaxseed and flaxseed meal. In: *Cunnane, S.C., Thompson, L.U. (Eds.), Flaxseed in Human Nutrition*. Champaign, Illinois, 22–4.
- Blanloeil, Y., Le Teurnier, Y., Demeur., D. (1996).** Coricoide en anesthésie-réanimation. Conference d'actualiation, 399-420.
- Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie Phytochimie, plantes médicinales. *Edition:Tec and Doc lavoisier. 4eme édition*. Paris, 952.
- Bolsheva, N. L., Alexander, V., Zelenin., Inna, V., Nosova., Alexandra, V.,..... Muravenko. (2015).** The Diversity of Karyotypes and Genomes within Section Syllinum of the Genus Linum (Linaceae). *Revealed by Molecular Cytogenetic Markers and RAPD Analyti.*
- Cagin,Y. F., Parlakpinar, H., Vardi, N., Polat, A., Atayan.Y., MEHMET ALI Erdogan, M. M. A., Tanbek, K. (2016).** Effects of dexpanthenol on acetic acid-induced colitis in rats. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*, **12**, 2958-2964
- Carter, J. F. (1996).** Sensory evaluation of flaxseed of different varieties. In Proceedings of the 56th Flax Institute of the United States. *Fargo North Dakota: Flax Institute of United States*, 201-203
- Coskuner, Y., Karababa, E. (2007).** Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Eng*, **78**, 1067–1073.

Eleftheriadis, N., Lambrecht, D'Haens, G., Baert, F., Cabooter, M., Louis, E.,..... De Vos, M. (2007). Maintenance therapy for ulcerative colitis has no impact on changes in the extent of ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, **1**, 21-27.

Fan, Y.F., Xie, Y., Liu, L., Man Ho, H., Wong, Y. H., Liu, Z. Q. (2012). Paeoniflorin reduced acute toxicity of aconitine in rats is associated with the pharmacokinetic alteration of aconitine. *Journal of Ethnopharmacology*.

Fasci-Spurio, F, Meucci, G, Papi, C, Saibeni, S. (2017). Digestive and Liver Disease. The use of oral corticosteroids in inflammatory bowel diseases in Italy: *An IG-IBD survey*, **49**, 1092-1097.

Fazio, V W., Marchetti, F., Church, J. M., Goldblum, J. R. (1996). Effect of Resection Margins on the Recurrence of Crohn's Disease in the Small Bowel.

Freeman, T.P. (1995). Structure of flaxseed. In Cunnane, S. C. and Thompson, L. U.(Eds). Flaxseed in Human Nutrition. *Champaign Illinois: AOCS Press*, 11-21.

Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A. P., Hashash, J. G. (2018). Disease-a-Month. *A comprehensive review and update on Crohn's disease*, **64**, 20-57.

Ganorkar, P. M. and Jain, R. K. (2013). Flaxseed – a nutritional punch, Department of Food Processing Technology, A.D. Patel Institute of Technology, New Vallabh Vidya Nagar, Anand, Gujarat 388121, India.

Gupta, A. P., Pandotra, P., Kushwaha, M., Khan, S., Sharma, R., Gupta, S. (2015). Alkaloids: A Source of Anticancer Agents from Nature, 341-431.

Guillotín, V., Galli, G., Viallard, 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**, 421-426.

Hansen, R., Cameron, F. L., Hold, G. L., El-Omar, E. M., Russell, R. k. (2010) Inflammatory bowel disease.

Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. Paris: 2^{ème} édition américaine, de Boeck et Lancier S A. 514.

Hurabielle, M et Paris, M. (1980). *Pharmacognosie. Abrégé de Matériel Médical. Plante à alcaloïdes*, **2**, 256-262.

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

Khan, H., Nabavi, S. M., Sureda, A., Mehterov, N., Gule, D., Berindan-Neagoe, I., Taniguchi, H., Atanasov, A. G. (2017). Therapeutic potential of songorine, a diterpenoid alkaloid of the genus *Aconitum*. *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Khan, M. (2007). Anti-inflammatory potential of alkaloids as a promising therapeutic modality. *University, Mardan, KPK, Pakistan*, **14**, 240-249.

Khan, S., Khan, H., (2016). Anti-cancer Potential of Phyto-alkaloids. *Current Cancer Therapy Reviews*, **12**.

Kolios, G., Valatas, V., and Ward, S.G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: *a universal messenger in an unsolved puzzle*. *Immunology*, **113**, 427–437

Kordjazzy, N., Haj-Mirzaian, A., Haj-Mirzaian, A., Rohani, M. M., Gelfand, E.W., Rezaei, N., Abdolghaffari, A. H. (2018). Pharmacological Research/ Title: *Role of Toll-Like Receptors in Inflammatory Bowel Disease*, **129**, 204-215.

Gutte, K. B., Sahoo, A. K., Ranveer, R. C.(2015). Bioactive Components of Flaxseed and its Health Benefits. *International journal of pharmaceutical Sciences Review and Research*.

Larkins, N et Wynn, S. (2004). Pharmacognosy: phytomedicines and their mechanisms Wynn. *Vet Clin Small Anim*, **34**, 291–327

Ley, D., Jones, J., Parrish, J., Salih, S., Caldera, F., Tirado, E . (2018). Gastroenterology. *Methotrexate Reduces DNA Integrity in Sperm From Men with Inflammatory Bowel Disease*.

Loureiro, A. C. C. F., Barbosa, L. E. R (2018). Appendectomy and Crohn's Disease. *Journal of Coloproctology*, **8**.

Lynch, R. W., Churchhouse, A. M., Protheroe, A., Arnott I. D., Group UIAS. (2016). Predicting outcome in acute severe ulcerative colitis: *comparison of the Travis and Ho scores using UK IBD audit data*. *Aliment Pharmacol Ther*, **43**, 1132.

Macken, L., Blaker, P. A.(2015). Management of acute severe ulcerative colitis (NICE CG 166). *Clin Med (Lond)*, **15**, 473

Maillard, V., Bougnoux, P., Ferrari, P. (2002). Omega 3 and Omega 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.

Mekhjian, H. S., Switz, D. M., Watts, H. D., Deren. J. J., Katon, R. M., Beman, F. M. National Cooperative Crohn's Disease Study: *factors determining recurrence of Crohn's disease after surgery.* *Gastroenterology* 979, **77**, 907.

Moreau, F. (1964). Alcaloides et plantes alcaloifères. *Edition presses universitaires de France Paris*, 11-128

Mueller, K., Eisner, P., Yoshie-Stark, Y., Nakada, R., Kirchhoff, E. (2010). Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal(*Linum usitatissimum*), *J. Food Eng.* **98**, 453-460.

Myers, B. S., Martin, J. S., Dempsey, D. T., Parkman, H. P., Thomas, R. M., Ryan J. P. (1997). Acute experimental colitis decreases colonic circular smooth muscle contractility in rats. *Am J Physiol* 273, 928-936.

Muir, A. D., Neil, D. (2003). Flax the genus *linum* Westcott Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon, Saskatchewan, *Canada*.

Nakhai, L. A., Mohammadirad, A., Yasa, N., Minaie, B., Nikfar, S., Ghazanfari, G.,.....Boushehri, V. S. (2007). Benefits of zataria multiflora boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **4**, 43–50.

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.

Picco, M. F., Cangemi, J. R. (2009). *Gastroenterology Clinics of North America. Inflammatory Bowel Disease in the Elderly.* **38**, 447-462.

Plevy, S. (2002). The immunology of inflammatory bowel disease, **31**, 77–92.

Pradha, R. C., Meda, V., Rout. P. K., Naik, S., Dalai, A. K. (2010). Supercritical CO₂ extraction of fatty oil from flaxseed and comparison with screw press expression and solvent extraction processes.

Rasmussen, H. E., Hamaker, B. R. (2017). *Gastroenterology Clinics of North America. Prebiotics and Inflammatory Bowel Disease,* **46**, Pages 783-795.

Ray, C., Sagar, P. (2017). *Surgery(Oxford). Management of Crohn's disease and ulcerative colitis,* **35**, 439-442.

René, M et Frnacois, C. (2000). The Metabolism and Biochemical Actions of Alkaloids in Animals, **22**, 3-5.

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

Rubilar, M., Gutiérrez, C., Vedugo, M., Shene, C., Sineiro, J. (2010), Flaxseed as a source of functional ingredients. *Journal of soil Science, Plant Nutrition*. **10**, 373–377.

Sahoo., Ranveer, R. C. (2015). Bioactive Components of Flaxseed and its Health Benefits. *International journal of pharmaceutical Sciences Review and Research*.

Sairenji, T., Collins, K. L., Evans. D.V. (2017). Primary Care: Clinics in Office Practice. *An Update on Inflammatory Bowel Disease*, **44**,673-692

Salinthon, S., Singer, C. A., Gerthoffer, W. T. (2004). Inflammatory gene expression by human colonic smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, **287**, 627–637.

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 of North America*, **43**, 479-494.

Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P .G., Wang, Y., Martin, J. T. (2014). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: *A review. Reaney*.

Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P., Vyas, S.P., Shukla, S., Bajpai, V.K. (2010). Studies on Anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella*F. seed oil in experimental animal models. *Food and chemical toxicology*. **48**, 61–64.

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

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

Réactifs

- Acide acétique (CH_3COOH) a 5%.
- Di-Éthyl-Éther.
- Chloroforme CHCl_3 .
- Eau distillée.
- Eau physiologique a 9%.
- Formol.
- Ether de pétrole.
- Ammoniaque NH_4OH .
- Acide hydrochlorique HCL à 37%.
- Méthanol 96%.

Appareils

- Agitateur magnétique.
- Étuve.
- Ampoule à décanter.
- Micropipettes 1000 μl .
- Éprouvette, Becher, cristalliseur.
- Pince et ciseau.
- Mortier.
- Spatule.
- Seringues et sonde de gavage.
- Entonnoirs en verre.
- Barreaux magnétiques.

Glossaire

Anastomose : Il s'agit en général de connexions entre vaisseaux sanguins, ou d'autres structures tubulaires telles une boucle de l'intestin.

Antiplaquettaire : Les antiplaquettaires regroupent plusieurs substances utilisées pour prévenir la formation de caillots sanguins dans les veines et les artères.

Budésonide : Un médicament anti-inflammatoire (glucocorticoïde), utilisé pour soigner la maladie de crohn, pour le traitement de l'asthme, la rhinite non infectieuse, et pour le traitement et la prévention des polypes nasaux.

Cellules caliciformes : Les cellules caliciformes se trouvent entre les cellules des épithéliums de revêtement simple ou pseudostratifié, ont pour but de sécréter le mucus.

Diapédèse : C'est la migration des éléments sanguins (en particulier les globules blancs) hors des capillaires.

DL-50 : La dose létale médiane (**DL₅₀**), ou concentration létale médiane (**CL₅₀**), est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance.

Diverticulite : C'est une infection d'un ou de plusieurs diverticules du segment sigmoïde du côlon.

Immunothérapie : Un traitement où le médicament ne pallie pas à une défaillance immunitaire de l'organisme, mais stimule les propres réactions de défense de celui-ci.

Immunomodulateurs : Un traitement qui stimule ou freine les réactions du système immunitaire du corps « modulation ».

Laxatif : Un laxatif est un traitement médicamenteux qui entraîne l'accélération du transit intestinal.

Métalloprotéines : Protéines associées à un élément métallique, permettant le transport de celui-ci de son lieu d'absorption vers le lieu de stockage dans l'organisme.

Proctectomie : C'est l'intervention qui enlève le rectum, totalement ou en partie, laissant en place le colon en amont et l'anus en aval.

Résumé

Le but de la présente étude était d'évaluer la toxicité aiguë et le pouvoir anti-inflammatoire (aiguë et sub-aiguë) de la fraction alcaloïde de *Linum usitatissimum* sur la colite ulcéreuse qui a été induite par l'administration rectale d'acide acétique 5% chez des souris albinos de souche NMRI, les résultats obtenus ont montré que l'extrait des alcaloïdes de *Linum usitatissimum* est non toxique ($DL50 > 2000 \text{mg/kg}$), et que son activité anti-inflammatoire a réduit significativement le rapport P/L du colon en comparaison avec le lot traité par le médicament de référence (dexaméthasone). Ces résultats suggèrent que les alcaloïdes de *Linum usitatissimum* améliorent la sévérité de la colite en éliminant les radicaux libres dérivés de l'oxygène et la diminution des taux de l'IFN- γ et du TNF- α .

Mots clés

Linum usitatissimum, alcaloïdes, toxicité aiguë, anti-inflammatoire

Abstract

The purpose of the present study was to evaluate the acute toxicity and anti-inflammatory (acute and sub-acute) activity of the alkaloid fraction extract from *Linum usitatissimum* on ulcerative colitis induced by rectal administration of acetic acid 5% in NMRI strain albino mice. The results of the intestinal anti-inflammatory test showed that alkaloids extract from *Linum usitatissimum* reduced significantly the ratio P/L. These results suggest that the alkaloids of *Linum usitatissimum* improve the severity of colitis by eliminating free radicals derived from oxygen, reducing the infiltration of neutrophils which can decrease IFN- γ and TNF- α levels

Key words

Linum usitatissimum, alkaloids, acute toxicity, anti-inflammatory

المخلص

كان الغرض من هذه الدراسة هو تقييم السمية الحادة و النشاط المضاد للالتهابات (الحاد و الشبه الحاد) من مستخلص القلويدات الموجودة في لينوم اوزيطسيموم على التهاب القولون التقرحي الناتج عن حمض الأسيتيك المخفف (5%) للفئران البيض من سلالة NMRI والتي أظهرت أن مستخلص القلويدات غير سام ($LD50 > 2000 \text{mg / kg}$) وأن نشاطه المضاد للالتهابات قلل إلى حد كبير نسبة P/L من القولون مقارنة مع الدواء (ديكساميثازون), هذه النتائج تقترح أن هذه القلويدات يحسن حدة المرض عن طريق القضاء على الجذور الحرة المشتقة من الأوكسجين وخفض معدل IFN γ و TNF α الكلمات الدالة

لينوم اوزيطسيموم, قلويدات, السمية الحادة, المضادة للالتهابات