

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

YAHLA Ines et MOKRI Ikram

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité: Nutrition et Pathologie

THÈME

**Effet Thérapeutique des Peptides du
Poupe sur L'inflammation Colique
Induite *In Vivo***

Soutenue publiquement le 07 /07/2021

DEVANT LE JURY

Président	Dr KEDDARI Soumia	MCA	U. Mostaganem
Encadrante	Dr YAHLA Imène	MCB	U. Mostaganem
Examineurs	Dr CHAALEL Abdelmalek	MCA	U. Mostaganem
Co-encadrante	Melle BOUHEND Abla	Doctorante	U. Mostaganem

Thème réalisé à l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem au laboratoire LMBAFS

Dédicace

C'est avec immense fierté et respect que je dédie ce modeste travail :

A ceux qui donnent un sens à mon existence, à la lumière de mes yeux en témoignage de votre affection et de votre amour, pour votre patience et votre soutien pendant tous les moments que j'ai traversé,

*A ma très chère **mère** et Mon très cher **père**.*

J'espère Que dieu vous protège et vous garde.

A mes grands-parents

A ma très chère sœur Imène

A mes très chers frères Ilyes et Mohamed Ihab

A ma meilleure amie, ma binôme : Mokri Ikram

A ma cousine : Asmae

A mes chères amies : Nadjet, Hanane, lamyia et Nour

Ines

Dédicace

C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :

À L'être le plus cher de ma vie: ma mère , la source de bonheur, mon espoir et mon courage " Saliha".

À mon idole et grand exemple, mon père qui fait ma force "Benali".

À mes deux chères sœurs, qui m'ont toujours soutenu "Imane" , "Alae".

À mon petit bonhomme mon neveu, ma joie de vivre "Anas".

À tous mes oncles et tantes, cousins et cousines.

À ma meilleure amie, ma binôme, " Ines".

À Mon inoubliable professeur superviseur Dr. YAHLA.

À mes très chères amies : Hanane, Lamyia et Ahlem.

À toute ma promotion Nutrition et Pathologie, et a tous les personnes qui ont contribuer de près ou de loin a l'élaboration du présent mémoire.

Ikram

Remerciements

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **DIEU** le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier tout d'abord notre chère encadrante **Dr. YAHLA Imène**, maitre de conférence B à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour ses enseignements qui nous ont éclairés, pour ses encouragements et ses précieux conseils, pour l'orientation, la confiance, la gentillesse, sa compréhension et son aide sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*Nous remercions davantage notre co-encadrante Melle **BOUHEND Abla**, doctorante à l'université de Mostaganem, d'avoir participé à la réalisation de ce modeste travail et de nous avoir suivi durant notre stage.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements également au **Dr. KEDDARI Soumia**, Maitre de conférences A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem et au **Dr. CHAALEL Abdelmalek**, Maitre de conférences A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem qui nous ont fait l'honneur de faire partie du jury pour évaluer ce modeste travail.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à la technicienne du laboratoire des Microorganismes Bénéfique, des Aliments Fonctionnels et de la Santé, **Mme Hamed Djahira***

*Nos vifs remerciements s'adressent à tous nos enseignants sans exception, à tout le personnel du laboratoire d'anatomie -pathologie de L'hôpital Che-Guevara Mostaganem **Dr BENCHAIIB, Mr TAHRI Mustapha** merci pour le soutien et pour vos efforts avec nous. .*

Enfin je remercie tous ceux et celles qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

RESUME

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ou MICI) regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Toutes deux se caractérisent par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif, due à une dérégulation du système immunitaire intestinal. Cette inflammation incontrôlée est responsable de lésions tissulaires et de la chronicité de la maladie. L'objectif de ce modeste travail consiste à explorer l'effet thérapeutique des peptides bioactifs du poulpe sur l'inflammation colique induite *in vivo* chez des rats Wistar. L'inflammation a été induite par l'acide acétique, en parallèle, les rats ont subi des traitements quotidiens à but préventif et curatif ont été faits par gavage de l'extrait des peptides du poulpe à des concentrations de 100 et 400 mg/kg pendant 7 jours. La Sulfasalazine a été utilisée comme un médicament anti-inflammatoire de référence. Les résultats obtenus démontrent que les traitements préventif et curatif ont réussi à faire face contre l'inflammation et à optimiser les paramètres hématologiques avec une amélioration tissulaire dans l'étude histologique.

Mots clés : Inflammation, colite, peptides bioactifs, poulpe.

الملخص

الامراض الالتهابية المزمنة للامعاء تجمع مرض كرون و التهاب القولون التقرحي الذان يتميزان بالتهاب جدار الجهاز الهضمي الذي يسبب ضرر في جهاز مناعة المعوي المسؤولة في تلف الانسجة و ازمان هذا المرض. الهدف من عملنا هذا هو استكشاف التأثير العلاجي لبينتيادات الاخطبوط على التهاب المعوي في المختبر عند الفئران Wistar . الالتهاب تم احداثه بالحمض الاسيتيك بالتوازي فئران اخرى خضعت لعلاج يومي لغرض وقائي و علاجي عن طريق التغذية القصرية من بينتيادات الاخطبوط بتركيزات ذات 100 و 400 مغ/كغ لمدة سبعة ايام. Sulfasalazine استعمل كدواء مرجعي مضاد للالتهاب. النتائج التي تم الحصول عليها برهنت ان علاجي وقائي نجح في مواجهة الالتهاب و تحسين اعراض الانسجة في الدراسة النسيجية.

الكلمات المفتاحية : التهاب ، حمض الاسيتيك ، التهاب قولون التقرحي ، بينتيادات الاخطبوط ، الانسجة.

ABSTRACT

Chronic inflammatory bowel disease (IBD) includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Both are characterized by inflammation of the wall of part of the digestive tract, due to deregulation of the intestinal immune system. This uncontrolled inflammation is responsible for tissue damage and chronic disease. The objective of this modest work is to explore the therapeutic effect of bioactive octopus peptides on in vivo induced colic inflammation in Wistar rats. The inflammation was induced by acetic acid, in parallel, the rats underwent daily preventive and curative treatments were made by gavage of the extract of the octopus peptides at concentrations of 100 and 400 mg/ kg for 7 days. Sulfasalazine was used as a reference anti-inflammatory drug. The results show that preventive and curative treatments have been successful in coping with inflammation and optimizing haematological parameters with tissue improvement in the histological study.

Keywords: Inflammation, colitis, bioactive peptides, octopus.

La Table des matières

Dédicace

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Listes des figures

Introduction..... 1

Partie I : Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : LA COLITE INTESTINALE

I.1. Anatomie du côlon..... 3

I.1.1. Anatomie macroscopique..... 3

I.1.2. Anatomie microscopique..... 3

I.2 Physiologie du colon 4

I.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin MICI..... 4

I.4. Les formes de la rectocolite hémorragique..... 5

I.5 Epidémiologie de la RCH..... 6

I.5.1. Dans le monde..... 6

I.5.1.1. Distribution géographique..... 6

I.5.2. En Algérie..... 7

I.6 Etiologie de la RCH..... 8

I.6.1.Facteurs génétiques.....	9
I.6.2.Facteurs Environnementaux.....	10
I.6.3.Facteurs psychologiques.....	12
I.6.4.Facteurs microbiens.....	12
I.7.Immun-pathologie de la RCH.....	12
I.8. Implication du-stress oxydatif dans la RCH.....	14
I.9.Symptômes et complications.....	15
I.10.Traitement médical.....	15

CHAPITRE II : LES PEPTIDES BIOACTIFS

II.1. Production des peptides bioactifs de poisson	17
II.2. Peptides bioactifs de poisson anti-inflammatoires.....	18
II.3. Hydrolysats et peptides bioactifs de poisson antioxydants.....	19
II.4.Peptides bioactifs de poisson cardioprotecteurs.....	20
II.5.peptides bioactifs de poisson dans la sensibilité à l'insuline.....	22
II.6. Peptides antihypertenseurs.....	25
II.7. Description de l'espèce étudiée.....	25
II.7.1. Position systématique, morphologie	25

Partie II : Partie Pratique

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1. Matériel	27
III.1.1. Echantillon.....	27
III.1.2. Modèle animal.....	27
III.2. Méthodes.....	28

A.Préparation de l'extrait du poulpe.....	28
B. Conception de l'étude.....	29
C. Induction de la colite.....	29
D.Traitement des rates.....	30
III.3. Observations générales et score clinique.....	31
a. la variation de la perte de poids corporel	32
b. Score de la consistance des selles.....	32
c. Score des saignements.....	33
III.4. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes.....	33
III.5. Étude histologique des organes.....	34
III.5.1. Étude macroscopique.....	34
III.5.2. Étude microscopique.....	34
A.La circulation (déshydratation).....	34
B.Inclusion et enrobage	36
C.La microtomie (La coupe).....	36
D.Etalement et la préparation des lames.....	37
E.La Coloration.....	37
F.Le montage	38
G.Lecture microscopique	39
Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION	
IV.1. Observations générales et scores cliniques.....	40
IV.2.Evolution pondérale.....	40

IV.3.Consistance des selles.....	41
IV.4.Saignement.....	42
IV.5. Scores macroscopiques.....	42
IV.6. Paramètres hématologiques.....	44
IV.7. Scores histologiques.....	46
CONCLUSION	48

Références Bibliographiques

Liste Des Figures

Figure 1 : Anatomie du gros intestin.....	3
Figure 2 : histologie du côlon.....	3
Figure 3 : Les MICI : a) Rectocolite hémorragique. b) maladie de Crohn.....	5
Figure 4 : Formes de la RCH.....	6
Figure 5 : La carte mondiale de la maladie inflammatoire de l'intestin.....	7
Figure 6 : Représentation schématique de la pathogénie de la RCH.....	9
Figure 7 : Différence entre le système immunitaire intestinal chez une personne saine (A), et chez une personne atteinte de RCH (B).....	14
Figure 8 : <i>Octopus vulgaris</i>	25
Figure 9 : vue latérale interne de l' <i>Octopus</i>	26
Figure 10 : Conditions d'élevage.....	27
Figure 11 : Modèle animal étudié.....	27
Figure 12 : Broyage du poulpe.....	28
Figure 13 : Agitation du poulpe.....	28
Figure 14 : Filtration de l'extrait.....	29
Figure 15 : Collecte de l'extrait.....	29
Figure 16 : Induction de la colite par l'acide acétique.....	30
Figure 17 : Identification des rates.....	30
Figure 18 : Sacrifice des rats.....	33
Figure 19 : Prélèvement du sang.....	33
Figure 20 : Réalisation des fragments.....	34
Figure 21 : Automate (Leica) de la circulation (déshydratation).....	35

Figure 22 : Appareil à paraffinage.....	36
Figure 23 : La microtomie.....	37
Figure 24 : Les bacs de la coloration HE (Hématoxyline Eosine).....	38
Figure 25 : Les lames après la coloration.....	39
Figure 26 : Observation microscopique et prise de photo.....	39
Figure 27 : effets des peptides du poulpe et sulfasalasine et l'acide acétique sur l'évolution pondérale des souris	41
Figure 28 : Réctorragie.....	42
Figure 29 : érythème.....	42
Figure 30 : Coupes histologiques des colons des différents lots expérimentaux.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Études in vivo utilisant des hydrolysats de poisson sur l'évolution de paramètres impliqués dans le développement du MetS.....	24
Tableau 2 : la variation de la perte de poids corporel.....	32
Tableau 3 : Score de la consistance des selles.....	32
Tableau 4 : Score des saignements.....	33
Tableau 5 : Effets des peptides du poulpe et sulfasalazine et l'acide acétique su la longueur et le poid de côlon des souris.....	43
Tableau 6 : les résultats de FNS des souris témoins et des souris traitées avec l'extrait des peptides du poulpe et des souris traitées avec sulfasalazine.....	45

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des pathologies multifactorielles complexes d'étiologie inconnue. Différentes mutations génétiques, l'exposition à des facteurs environnementaux ou une perte d'homéostasie du microbiote intestinal sont impliqués en proportions variables dans la perte de la fonction de barrière de la muqueuse, son invasion par les microorganismes intestinaux et finalement, le déclenchement d'une réponse inflammatoire excessive et chronique provoquant les lésions caractéristiques de ces pathologies. Différents composants du système immunitaire muqueux comme les cellules épithéliales intestinales, les cellules du système immunitaire inné et adaptatif et les médiateurs de l'inflammation sont impliqués dans la pathogenèse des MICI (**Hanauer, 2006**).

Aujourd'hui, de nombreuses thérapies médicamenteuses sont proposées afin de diminuer le nombre de poussées, maintenir la rémission et améliorer la qualité de vie des patients atteints par ces inflammations, les médicaments conventionnels pour la colite ulcéreuse comprennent les anti-inflammatoires (les aminosalicylates, les corticostéroïdes), les immunosuppresseurs, mais ils sont responsables d'effets indésirables (**Rch et al., 2010**).

La médecine moderne s'est penchée vers l'utilisation de produit bioactifs d'origine végétale et animale, les produits naturels continuent d'être une source majeure de produits pharmaceutiques et pour la découverte de nouvelles structures moléculaires (**Fahmy, 2013**).

Le poulpe contient de l'acide eicosapentaénoïque (AEP) et de l'acide docosahexaénoïque (ADH), deux acides gras de la famille des oméga-3. Ceux-ci agissent comme précurseurs de messagers chimiques favorisant un bon fonctionnement immunitaire, circulatoire et hormonal.

Les peptides du poulpe sont une sorte de substance marine bioactive multifonctionnelle en tant qu'antioxydant, anti-inflammatoire, cardio-protecteurs et antihypertenseurs.

La présente étude a pour objectif de démontrer l'effet thérapeutique des peptides du poulpe sur l'inflammation colique induite in vivo.

Ce manuscrit est composé de deux parties, une partie bibliographique contenant deux chapitres. Le premier chapitre aborde la colite intestinale et le deuxième chapitre s'intéresse à l'effet des peptides bioactifs sur la santé.

La partie expérimentale est divisée en deux chapitres, le premier présente le matériel et les méthodes utilisées dans ce modeste travail, et la seconde est consacrée pour la discussion des résultats obtenus, et enfin une conclusion générale qui résumera l'ensemble de ces résultats.

Partie I :
Synthèse bibliographique

CHAPITRE I :
LA
COLITE INTESTINALE

CHAPITRE I : LA COLITE INTESTINALE

I.1. Anatomie du côlon

I.1.1. Anatomie macroscopique

Le côlon également nommé le gros intestin, est une partie du tube digestif située après l'intestin grêle faisant suite à l'iléon au niveau de l'angle iléo-caecal et se termine au niveau de la jonction recto-sigmoïdienne en se poursuivant par le rectum puis le canal anal et l'anus qui représente la partie terminale de tube digestif, il mesure en moyenne 1,5 mètre pour un diamètre moyen de 2,5 à 7 cm et décrit un trajet en cadre parcourant la quasi-totalité de l'abdomen (Marrieb, 1999).

Plusieurs segments coliques peuvent être décrits (Figure 1). On distingue successivement : le caecum, le colon ascendant, l'angle colique droit, le colon transverse, l'angle colique gauche, le colon descendant et le colon pelvien ou sigmoïde. (David *et al.*, 2020).

I.1.2. Anatomie microscopique

De point de vue histologique, le côlon est constitué de quatre couches allant de l'intérieur vers l'extérieur incluant (Figure2) : la muqueuse organisée en épithélium, membrane basale, chorion, musculaire muqueuse respectivement ; la sous-muqueuse ; la musculuse et la séreuse. (Colitis, 2003).

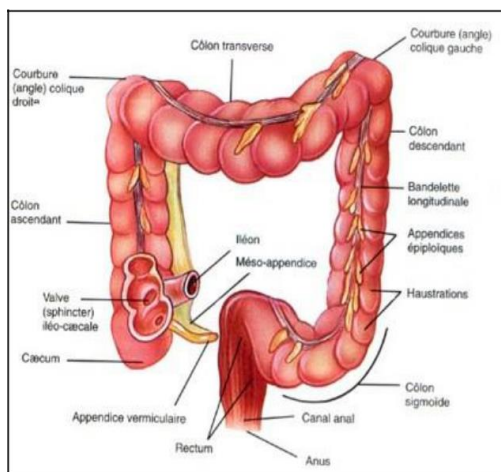


Figure 1 : Anatomie du gros intestin

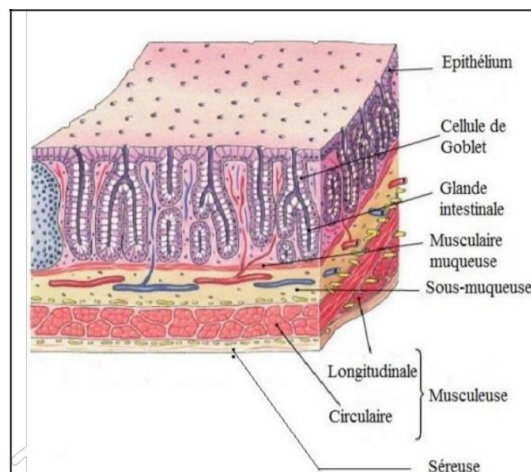


Figure 2: histologie du côlon. (Burkitt, 1979).

I.2 Physiologie du colon

Le colon peut être décrit schématiquement en deux parties fonctionnelles :

1. Un colon proximal (caecum, colon droit jusqu'à la moitié du colon transverse) dont le rôle est essentiellement l'absorption de l'eau et des électrolytes.
2. Un colon distal (moitié gauche du colon transverse, colon gauche, sigmoïde et 'rectum'), possédant une fonction de stockage et d'évacuation des déchets de l'alimentation.

De plus le colon assure une activité métabolique non négligeable, du fait de l'importance de la flore bactérienne qu'il héberge. Ces colonies de micro-organismes sont inoffensives et ont en réalité des effets bénéfiques :

1. Rôle nutritionnel : tel que la synthèse de la vitamine K
2. Rôle d'hydrolyse des protéines endogènes (issues de la desquamation cellulaire) par les peptidases bactériennes
3. Rôle d'hydrolyse des glucides non digestibles par les enzymes bactériennes qui par fermentation produisent des gaz intestinaux et des monosaccharides dont la digestion bactérienne produit des acides gras volatiles à chaîne courte. Ces derniers jouent un rôle métabolique notable utilisés comme substrat énergétique par l'épithélium colique (**David et al., 2020**).

I.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin MICI

Les maladies inflammatoires chroniques ou cryptogénétique de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une inflammation chronique qui touche une ou plusieurs parties du tube digestif, dont la physiopathologie est complexe et encore mal élucidée faisant intervenir une prédisposition génétique, des désordres immunologiques ainsi que des facteurs environnementaux. Elles évoluent par poussées inflammatoires (phase symptomatique) entrecoupées par des phases de rémission (phase asymptomatique) (**Pariente, 1991**).

Ces pathologies regroupent deux entités distinctes la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) [14] , diagnostiquées en fonction de l'observation chez le patient de critères cliniques. Pour 15 % des patients souffrant de MICI, les signes observés ne permettent pas de définir l'une ou l'autre de ces entités pathologiques et on parle alors de « colite indéterminée » (**Pariente, 1991**).

La RCH est caractérisée par des ulcérations superficielles continues du revêtement intérieur du gros intestin (**Colitis, 2003;Cosnes et al., 2011**), dit muqueuse, et de la sous muqueuse, l'inflammation débute dans la couche muqueuse rectale pour s'étendre sur une partie ou sur la totalité du côlon sans atteindre d'autres segments du tractus digestif (**Figure 3a**). Elle comprend souvent des abcès cryptiques caractérisés par une infiltration abondante de neutrophiles et de monocytes qui limitent le renouvellement des cellules souches épithéliales.

Quant à la MC, la pathologie est caractérisée par des lésions plus profondes, dites transmuraux qui touchent les différentes couches de la paroi digestive, de la muqueuse à la séreuse de façon discontinue qui peut toucher tout le tractus gastro-intestinal de la bouche à l'anus (**Figure 3b**) (**Cosnes et al., 2011;Zhang et Li, 2014**).

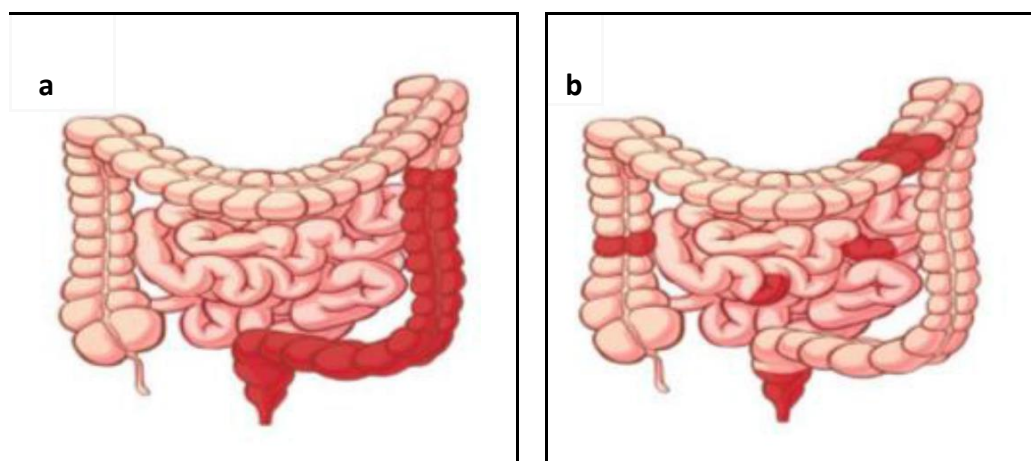


Figure 3 : Les MICI : a) Rectocolite hémorragique. b) maladie de Crohn (**Cosnes et al., 2001**).

I.4. Les formes de la rectocolite hémorragique

Selon l'extension de la maladie on distingue (**Figure 4**) :

- **Rectite** : l'atteinte se limite au rectum et est considérée comme le type le moins sévère de la maladie
- **Proctosigmoïdite** : L'inflammation se trouve dans le rectum et le colon sigmoïde
- **Colite distale** : l'atteinte se limite à la partie gauche du côlon, s'étend du rectum jusqu'au côlon descendant
- **Pancolite** : la RCH est étendue du rectum à la totalité du côlon. (**Cosnes et al., 2001**).

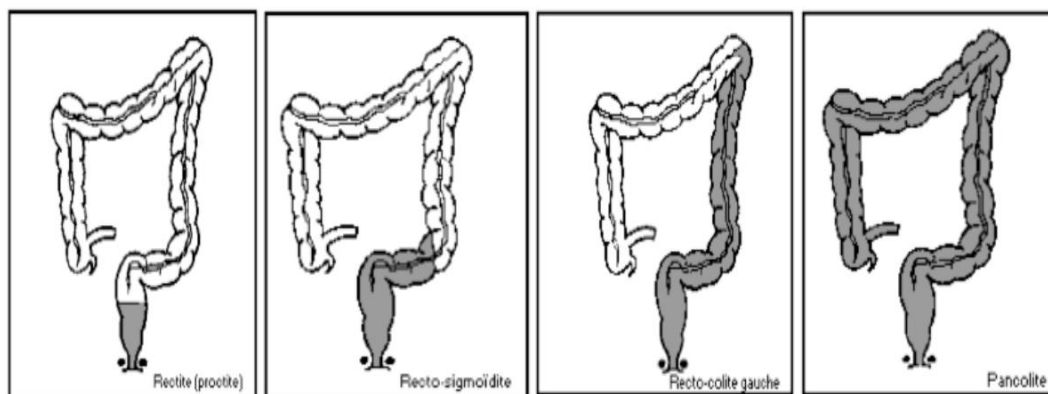


Figure 4: Formes de la RCH (Cosnes *et al.*, 2001).

I.5 Epidémiologie de la RCH

I.5.1. Dans le monde

I.5.1.1. Distribution géographique

La distribution géographique de la RCH a été rapportée dans presque tous les pays du monde. Cependant, la répartition de cette maladie est très inégale. Elle est plus fréquente dans les pays du Nord (Europe et Amérique du Nord) et les pays industrialisés malgré une augmentation dans le reste du monde. Une revue systématique des données de 167 études en population générale en Europe (1930-2008) 52 en Asie et au Moyen Orient (1950-2008) et 27 en Amérique du Nord (1920-2004), a permis les conclusions suivantes : les incidences annuelles les plus hautes pour la RCH sont estimées à 24,3/100 000 habitants en Europe, à 6,3 en Asie et au Moyen Orient et à 19,2 en Amérique du Nord. Les prévalences les plus élevées mesurées sont de 505 en Europe et de 249 pour en Amérique du Nord (Molodecky *et al.*, 2012; Loftus, 2014).

L'incidence de MICI était-elle plus faible chez les non-Blancs que chez les Blancs, cette différence a disparu parallèlement à l'amélioration du niveau socio-économique des non-Blancs ainsi une forte de l'incidence observée durant le 20^e siècle, il est commun de ce fait de penser que le risque de MICI est lié au développement socio-économique, à l'industrialisation ou à l'urbanisation (Molodecky *et al.*, 2012).

L'incidence des MICI peut être décomposée en plusieurs zones géographiques : celles à forte incidence, celles avec une incidence modérée, ceux avec une faible incidence (Figure 5)

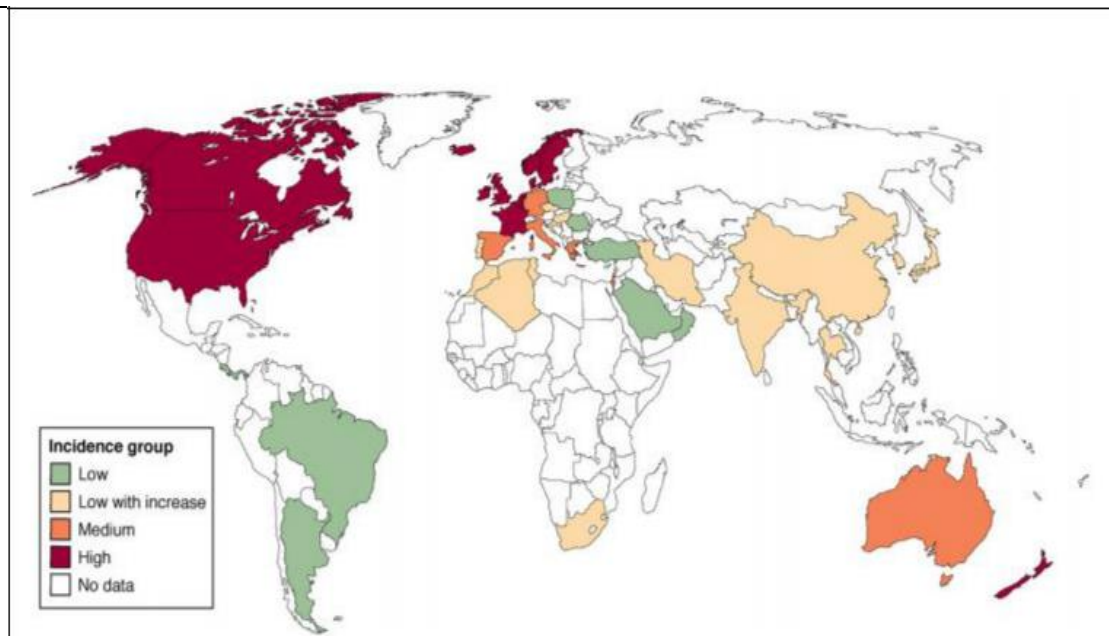


Figure 5: La carte mondiale de la maladie inflammatoire de l'intestin (Cosnes *et al.*, 2001)

Le rouge fait référence à une incidence annuelle supérieure à 10/100 000, l'orange à une incidence de 5 à 10/100 000, le vert à une incidence inférieure à 4/100 000, une incidence jaune à faible qui augmente continuellement. L'absence de couleur indique l'absence de données (Cosnes *et al.*, 2001).

L'âge : La RCH peut survenir à tout âge, cependant l'âge maximal de survenue est de 30 à 40 ans. Certaines études ont rapporté qu'un deuxième pic se produit à 60–70 ans [9]. Les MICI pédiatriques représentent 7% à 20% de tous les cas de MICI (Cosnes *et al.*, 2001).

Le sexe : La RCH est légèrement plus fréquente chez les hommes (Hanauer, 2006).

1.5.2. En Algérie

La maladie rectocolite hémorragique, connue comme étant fréquente dans les pays développés, se voit de plus en plus dans les pays en voie de développement avec une incidence annuelle de 1,38 nouveaux cas/an/100 000 habitants en Algérie (2003–2006), cependant la MC est plus fréquente que la RCH avec une incidence annuelle de 1,49 nouveaux cas/an/100 000. L'incidence annuelle moyenne du Crohn en Algérie connaît une recrudescence situant notre pays dans la zone d'incidence intermédiaire, d'où la nécessité d'une meilleure connaissance des différents aspects de la maladie.

- **Sexe :** RCH : légère prédominance masculine (1,03/1). MC : légère prédominance féminine (1,05/1).
- **Prevalence:** RCH:20,7 .10⁵ hab/an MC: 22,35 .10⁵ hab/an

Évolution épidémiologique en Algérie

- **RCH :** stable de 1981 à 2006 (1,24 ; 1,38).
- **MC :** accroissement de 1981 à 1998 (0,79 à 1,64) puis stabilisation de 1998 à 2006 (1,64 à 1,49). (Damouche *et al.*, 2016).

Tableau1.1 : Données épidémiologiques des MICI (1981-2006) (Damouche *et al.*, 2016).

Total MICI	141 (1981-19851)	250 (1994-1998)	330 (2003-2006)
RCH	86 (65%)	121(48.4%)	159(48.2%)
MC	55(39%)	129(51.6%)	171(51.8%)
RCH/MC	1.56/1	0.93/1	0.93/1
Colites (intermédiaires)	19/160	26/276 (9%)	5/335 (1.5%)

I.6 Etiologie de la RCH

La RCH est une pathologie multifactorielle complexe. Des études ont démontré l'implication, en proportions variables, de facteurs génétiques, environnementaux et un rôle du microbiote intestinal dans la survenue de cette pathologie (**Figure 6**). L'hypothèse étiologique actuelle décrit cette pathologie comme une réponse immunitaire anormale et inappropriée chez des sujets génétiquement prédisposés en réponse à une interaction complexe entre les facteurs environnementaux, des agents microbiens et le système immunitaire intestinal. (Pariente, 1991).

Parmi les agents microbiens, il semble peu probable que les agents infectieux classiques soient à l'origine de la RCH. En revanche, les données scientifiques récentes plaident pour le rôle clé d'une réponse immunitaire anormale dirigée contre le microbiote intestinal.

L'inflammation intestinale est en rapport avec une hyper activation de l'immunité innée et de l'immunité acquise. (David *et al.*, 2020)

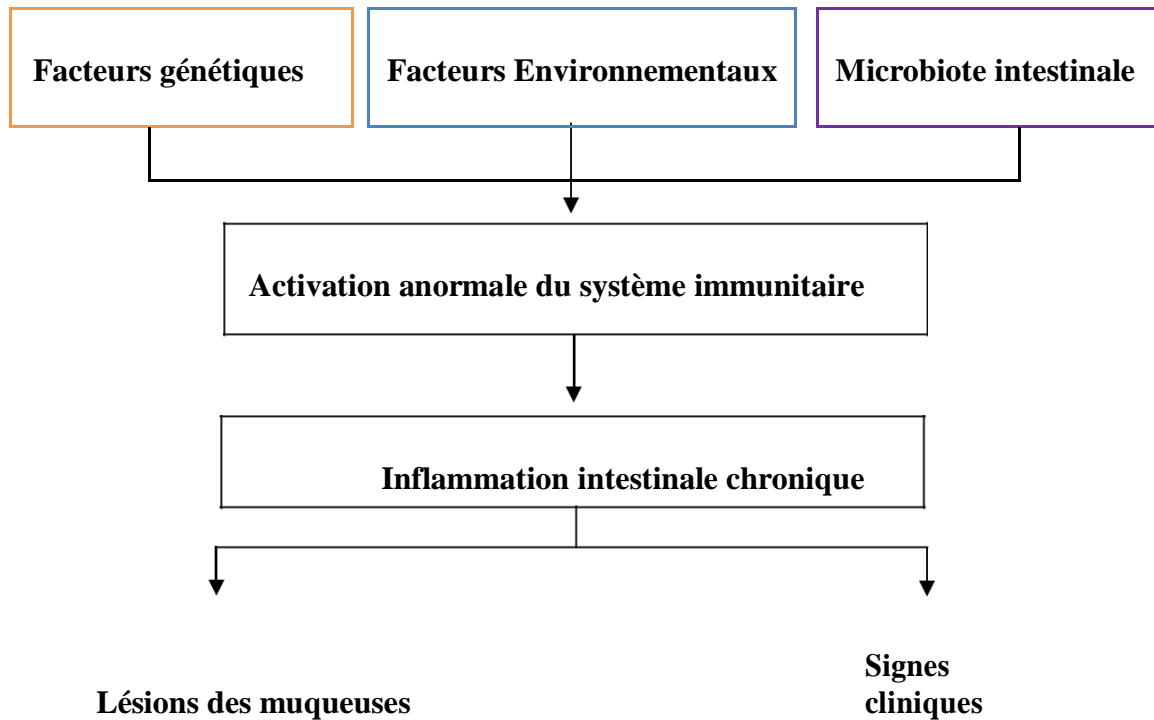


Figure 6 : Représentation schématique de la pathogénie de la RCH . (Pariente, 1991).

I.6.1.Facteurs génétiques

L'existence d'une composante génétique dans la pathogénie des MICI en générale et de la RCH particulièrement a été montrée de nombreuses façons :

1. Certaines ethnies sont plus à risque que d'autres. Ainsi, la population blanche est plus à risque et l'incidence de la RCH est deux à cinq fois supérieure dans la population juive.
2. Le pourcentage de formes familiales de la RCH varie de 5 à 20 %, et le risque de développer une RCH est augmenté entre 7 et 17 fois pour un individu ayant un parent au premier degré touché par la RCH.
3. La concordance chez les jumeaux surtout chez les monozygotes que les dizygotes représentent aussi un argument en faveur de la prédisposition génétique de la RCH et soutient donc largement cette hypothèse : le taux de concordance chez les

jumeaux monozygotes est de 13 à 19 % et seulement de 0 à 5% chez les jumeaux dizygotes.

4. La RCH et la maladie de Cohn sont des maladies polygéniques, plusieurs gènes incriminés ont été récemment identifiés, dont le mieux connu est le gène *nod2/CARD15* localisé sur le chromosome 16 (**Mattos *et al.*, 2015**).

I.6.2.Facteurs Environnementaux

L'implication de facteurs environnementaux dans l'apparition de la RCH sont basés sur des études épidémiologiques qui analysent les incidences et les prévalences de cette pathologie qui est plus fréquente dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement, l'étude de population migrant vers ces pays industrialisés a permis de montrer une forte augmentation des cas de la RCH chez les nouveaux arrivants par rapport à la population résidente. Cette corrélation entre l'apparition de la pathologie et les changements de mode de vie et d'environnement est un premier argument en faveur d'une composante environnementale. De nombreux facteurs environnementaux ont été étudiés, mais les seuls dont la responsabilité soit établie sont le tabac et l'appendicectomie. (**Shouval et Rufo, 2017**).

❖ Tabagisme

Le tabac protège de la rectocolite hémorragique et en atténue l'évolutivité (le risque est réduit d'environ 40% chez les fumeurs). Au cours de la RCH la production de mucus est diminuée et la perméabilité colique augmentée, l'effet protecteur du tabac et son composé principal "la nicotine" pouvant avoir un effet protecteur : en augmentant l'épaisseur du mucus, en réduisant la perméabilité colique et sur l'immunité colique en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires par blocage de la prolifération des cellules T (**Mattos *et al.*, 2015**).

❖ Appendicectomie

L'appendicectomie réduit de 70 % le risque d'apparition de la rectocolite hémorragique en cas d'intervention chirurgicale avant l'âge de 20 ans pour appendicite aiguë. L'appendicectomie est associée à une évolution moins grave de la rectocolite hémorragique, la maladie survenant plus tard dans la vie, avec moins de poussées

(**Mattos *et al.*, 2015**).

❖ **Alimentation**

Régime pauvre en fibres, (légumes et fruits), surconsommation de sucres raffinés, de graisses et protéines animales, de margarine, de fast-food, de graisses cuites, de microparticules, chaîne du froid non respectée, consommation d'eau du robinet, etc. augmentent la probabilité de survenance d'une maladie inflammatoire intestinale, mais aucun n'a été formellement identifié [23]. En revanche, un apport élevé en légumes était associé à un risque moindre de RCH. (Hou *et al.*, 2011).

❖ **Médicaments**

- La dose élevée, la durée prolongée de l'utilisation et l'utilisation fréquente des AINS (y compris l'aspirine) étaient associées à un risque accru de CU.
- L'antibiotique est un facteur environnemental important, influençant le risque de RCH par leur effet sur le microbiote. L'utilisation d'antibiotiques au cours de la première année de vie est plus fréquente chez les enfants atteints de RCH que chez les témoins.
- La prise des contraceptifs oraux, hormonothérapie substitutive, suggérés comme facteurs de risque potentiels pour l'RCH.
- Des études ont constaté que la carence en vitamine D était courante chez les patients diagnostiqués atteints de RCH et ont souligné qu'une faible teneur en vitamine D avait contribué à accroître le risque de RCH. (Zhang et Li, 2014).

❖ **Hypothèse d'hygiène**

Un niveau d'hygiène élevé dans l'enfance pourrait être associée à un risque supérieur de RCH. A l'inverse, les enfants vivant dans un milieu défavorisé au contact d'infections bactériennes et/ou parasitaires seraient protégés de ce risque du fait d'une meilleure « éducation » de leur système immunitaire. (Kabeerdoss *et al.*, 2011).

❖ **L'allaitement**

L'allaitement au sein peut protéger contre le développement de la MICI plus tard dans vie (Shouval et Rufo, 2017) en particulier pour RCH (Malik, 2015).

I.6.3. Facteurs psychologiques

Il existe des preuves constantes d'une contribution des facteurs psychologiques à l'évolution de la maladie MICI, en particulier le stress dans la CU et les symptômes dépressifs dans la MC. Des tests plus rigoureux d'interventions psychologiques dans les MICI sont nécessaires (**Hou et al., 2011**).

I.6.4. Facteurs microbiens

En plus des facteurs génétiques et environnementaux, de plus en plus d'arguments associent. La RCUH à une diminution de la biodiversité du microbiote intestinal et à son déséquilibre (appelé dysbiose) entre la quantité de bactéries dites « protectrices » et de bactéries dites « délétères » (**Farrell et LaMont, 2002**). Cette dysbiose pourrait être l'origine d'une instabilité de l'écosystème intestinal, menant à une réaction inflammatoire bien qu'elle puisse également être la conséquence de la maladie plutôt que sa cause (**Curtis, 2007**). Par ailleurs, il a été montré que les bactéries « protectrices » possèdent des propriétés anti-inflammatoires, d'une part en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules du système immunitaire et d'autre part en favorisant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (**Droz et al., 1990**). L'origine de la dysbiose des MICI est mal connue et il est difficile de conclure son rôle comme inducteur ou amplificateur de l'inflammation.

I.7. Immun-pathologie de la RCH

L'épithélium intestinal constitue une barrière entre la lumière intestinale et le milieu interne. En effet, les cellules épithéliales des villosités (cellules caliciformes ou en gobelet) sécrètent un mucus qui constitue à la fois une barrière physique, chimique et immunitaire face aux agents pathogènes et permet de séquestrer les micro-organismes (commensaux ou pathogènes) de la lumière intestinale (**Pariante, 1991**). Des peptides antimicrobiens sont synthétisés dans le mucus par les cellules épithéliales des cryptes (cellules de Paneth) permettent de lyser les membranes des bactéries qui y sont séquestrées, ensuite, la présence de jonctions serrées intercellulaires entre les cellules épithéliales rend la muqueuse impénétrable par les bactéries luminales (**Roda et al., 2010**).

La muqueuse intestinale contient également des cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles) en nombre

important pour lutter contre une éventuelle invasion microbienne. L'action conjointe de ces cellules permet de reconnaître les antigènes pathogènes et déclencher la réponse cellulaire de l'immunité innée (**Pariente, 1991**).

Des défauts au niveau de la barrière intestinale ont été rapportés chez les patients atteints de RCH. Les facteurs environnementaux et génétiques contribuent à la perte des mécanismes de contrôle de la flore intestinale comme la diminution de la sécrétion de mucus et de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales (**Khor et al., 2011**). Cela engendre la mise en place d'une dysbiose intestinale qui se traduit par l'inactivation de l'inhibition de la prolifération des bactéries « délétères ». Par ailleurs, en impactant également les jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium, ces facteurs provoquent l'augmentation de la perméabilité de la barrière physique épithéliale. Ainsi, les bactéries pathogènes pourront être en contact direct et de manière prolongée avec l'épithélium intestinal et envahir la lamina propria (**Kamada et al., 2013**).

Cette perte de la fonction de barrière aura pour conséquence une activation excessive du système immunitaire muqueux, puis l'apparition d'une inflammation chronique pour aboutir finalement à l'apparition des lésions observées chez les patients (**Mattos et al., 2015**). D'un point de vue mécanistique, cette activation excessive de la réponse immunitaire se traduit par une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses et les macrophages vont synthétiser des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-6 et IL-8. L'action conjointe de ces cytokines pro-inflammatoires et des antigènes pathogènes reconnus par les cellules dendritiques induiront la maturation complète de celles-ci. Après migration vers les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques matures synthétiseront un fort taux d'IL-12 pro-inflammatoire au lieu de l'IL-10 et la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en lymphocytes T effecteurs LTh1, LTh2 et LTh17, finalement, ces LT effecteurs vont amplifier l'inflammation en sécrétant à leur tour des cytokines pro-inflammatoires comme : IFN- γ , IL-4 et IL-17 (**Bennike et al., 2015**). En effet, les LTh1 permettent l'expansion de la réponse cellulaire en activant les LT cytotoxiques CD8⁺ et les macrophages qui vont permettre l'élimination des bactéries pathogènes. Les LTh2 permettent la mise en place d'une réponse immunitaire humorale pour combattre l'infection. Quant aux LTh17, ils sont impliqués à la fois dans le recrutement massif des cellules de l'immunité innée comme les neutrophiles responsables des lésions intestinales

mais également dans l'amplification de l'inflammation (Witowski *et al.*, 2015 ;Gálvez, 2014).

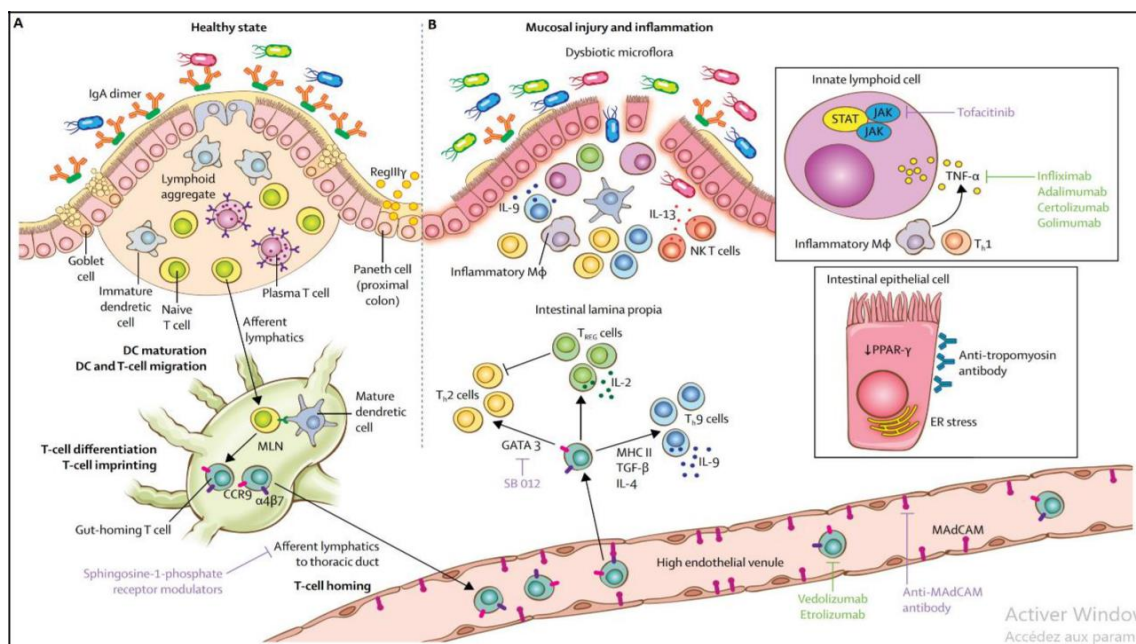


Figure 7 : Différence entre le système immunitaire intestinal chez une personne saine (A), et chez une personne atteinte de RCH (B). (Galvez, 2014).

I.8. Implication du-stress oxydatif dans la RCH

Le stress oxydant résulte du déséquilibre entre les systèmes pro-oxydant et les antioxydants, au profit de premiers. Il est impliqué dans nombreuse pathologie comme cause ou conséquence. Les espèces réactives de l'oxygène ERO sont capables d'endommager diverses biomolécules telle que les protéines les acides désoxyribonucléiques ADN ou les acides gras polyinsaturés. Étant donné que la production d'ERO comprenant l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux et les espèces hydroxyles radicales et azotées augmentent chez les patients atteints de MICI (Denson, 2015). Le stress oxydatif semble être le facteur pathogène crucial dans les MICI. De même, la caractéristique de la colite induite expérimentalement en utilisant l'acide acétique chez les animaux est un déséquilibre entre les substances oxydantes et antioxydantes. Il a été bien documenté que l'infiltration de neutrophiles conduit à la production d'anion superoxyde et à l'initiation d'une cascade pour la production de diverses espèces réactives. Cela peut conduire à la génération de radicaux hydroxyles et de peroxydes qui contribuent de manière significative à la progression de la nécrose tissulaire

et de la dysfonction muqueuse (Wéra *et al.*, 2016). En outre, les neutrophiles libèrent également des protéases et des médiateurs lipidiques qui contribuent en outre à la lésion intestinale. les ERO activent NF- κ B, ce qui conduit à la génération de cytokines pro inflammatoires et d'autres enzymes inductibles, comme la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les leucocytes et les macrophages (Andersen *et al.*, 2011).

I.9 Symptômes et complications

Les symptômes cliniques de La RCH sont liés à l'inflammation de la muqueuse du côlon, les plus fréquents étant les douleurs abdominales (appelées épreintes ou coliques) et la diarrhée accompagnée de pertes de sang et de glaires, la RCH peut également entraîner une fièvre ou un amaigrissement. En plus des manifestations digestives, des manifestations extra-digestives non spécifiques (douleurs des articulations, atteinte cutanée, inflammation des yeux ou une atteinte des voies biliaires) sont également souvent présentes et qui sont liées à la réaction anormale du système immunitaire. (Montbarbon, 2013).

Les complications digestives peuvent survenir lorsque la maladie est sévère il s'agit principalement : de mégacôlon toxique, péritonite et cancer du côlon. (Jess *et al.*, 2012).

I.10 Traitement médical

Le but principal de la prise en charge médicale est d'induire et de maintenir une rémission durable, l'éviction des rechutes et de prévenir les complications, les hospitalisations et le recours à la chirurgie. Le traitement conventionnel inclut les anti-inflammatoires, les immunosuppresseurs.

❖ Les anti-inflammatoires salicylés

Le traitement de première intention dans les maladies légères à modérées est le médicament 5-ASA, Il exerce une activité locale et anti-inflammatoire sur la muqueuse intestinale en activant le récepteurs gamma des proliférateurs de peroxysomes (PPAR- γ) permettant ainsi la réduction des cytokines pro inflammatoire (Desreumaux et Ghosh., 2006). Les aminosalicylés sont le plus souvent très bien tolérés mais ils sont susceptibles, de provoquer des effets secondaires : Maux de tête, nausées, vomissements, perte de cheveux, et diarrhée (Cosnes *et al.*, 2011).

❖ **Les anti-inflammatoires corticoïdes**

Dans les formes sévères, les corticoïdes sont utilisés pour réduire l'inflammation avec plus de puissance et plus rapidement. Les corticoïdes permettent l'inhibition de production de cytokines pro-inflammatoires, de la phospholipase A2 (responsable de la libération d'acide Arachidonique) et la production des radicaux oxygénés. **(Faubion et al., 2001)**.

Ils sont responsables d'effets indésirables : hypertension artérielle, prise de poids et gonflement du visage, perte de masse musculaire, troubles cutanés, déminéralisation des os (ostéoporose), troubles digestifs, troubles du sommeil et de l'humeur, troubles hormonaux, pour cette raison, les corticoïdes sont utilisés lorsque les traitements ne sont pas suffisamment efficaces. Le plus souvent, ils sont prescrits pour une période limitée afin de minimiser les effets indésirables. **(Rch et al., 2010)**.

❖ **Médicaments immunomodulateurs**

Ces médicaments qui « modulent » l'action du système immunitaire sont réservés aux formes de RCH les plus évolutives et les plus difficiles à contrôler (poussées fréquentes et/ou sévères). Ils sont proposés aux malades qui ne répondent pas aux traitements anti-inflammatoires. Ce sont des médicaments qui visent l'ensemble du système immunitaire et qui peuvent avoir des effets indésirables : troubles digestifs, chute des cheveux temporaire, augmentation du risque d'infections, toxicité pour le rein pouvant entraîner une insuffisance rénale et hypertension artérielle **(Rch et al., 2010)**.

❖ **Traitement chirurgical**

Un traitement chirurgical est indiqué dans les formes sévères de RCH, ou en cas de complications graves (hémorragie importante, perforation, mégacôlon toxique, cancer). Ce qui permet de soulager le malade des symptômes de la maladie. La colectomie totale, Anastomose iléo-anal et l'Anastomose iléo-rectale sont seules solutions après échec du traitement par médicaments **(Rch et al., 2010)**.

CHAPITRE II :
LES
PEPTIDES BIOACTIFS

CHAPITRE II : LES PEPTIDES BIOACTIFS

II.1. Production des peptides bioactifs de poisson

Les aliments fonctionnels sont définis par Santé Canada comme étant des aliments conventionnels fournissant des avantages physiologiques ou réduisant les risques de maladies chroniques, au-delà de leurs fonctions nutritionnelles de base (**Freitas et al., 2020**). Depuis ces vingt dernières années, il y a un intérêt majeur des scientifiques et des industriels pour les aliments fonctionnels, et notamment pour la production de peptides bioactifs (PB), qui résultent de l'hydrolyse d'une protéine initiale. Ce sont des séquences d'acides aminés (généralement entre 2 et 20), ayant des propriétés bénéfiques pour la santé humaine (**Harnedy et FitzGerald, 2012;Chalamaiah et al., 2012**). La recherche en agroalimentaire sur la production, la concentration et la caractérisation de ces PB, représente un véritable enjeu économique, écologique et sociétale (**Saadi et al., 2015**). Les protéines de poisson sont classées en trois groupes :

- Les protéines sarcoplasmiques (15 à 35% des protéines totales) présentent dans la sarcoplasme regroupant généralement des enzymes liées à la production d'énergie comme la créatine kinase ou l'aldolase (**Harnedy et al., 2020**).
- Les protéines myofibrillaires (65 à 75% des protéines totales), sont des protéines de structure, principalement composées de la myosine et de l'actine. Elles sont solubles à de hautes concentrations en sels (**Harnedy et al., 2020**).
- Les protéines du stroma ou tissu conjonctif (3% des protéines totales) composées essentiellement de collagène. Elles sont les moins solubles (**Harnedy et al., 2020**).

Cependant, la valeur nutritionnelle et l'activité biologique des PB dépendent de nombreux paramètres. La production des PB est donc devenue un réel enjeu pour les industriels (**Saadi et al., 2015**). Pour cela, deux techniques principales d'hydrolyses peuvent être utilisées : chimique ou enzymatique. Ces deux méthodes vont permettre la

rupture des liaisons peptidiques et donc la libération d'acides aminés (AA) libres ou de peptides.

II.2. Peptides bioactifs de poisson anti-inflammatoires

Le développement du MetS est accompagné d'une inflammation chronique. Un hydrolysate de saumon du Pacifique (*Oncorhynchus keta*) a montré une inhibition *in vitro* de la production d'oxyde nitrique (NO) ainsi que de molécules pro-inflammatoires (TNF α et IL6) dans des macrophages stimulés par LPS (Saigusa *et al.*, 2015). Cette réaction anti-inflammatoire était dose dépendante, avec une inhibition maximale à 500 μ g/ml (réduction de 66%, 68% et 85% des concentrations de NO, TNF α et IL6 respectivement). De plus, l'expression des gènes codant pour la protéine iNOS et des cytokines TNF α et IL6 étaient aussi réduits par l'hydrolysate de saumon (Saigusa *et al.*, 2015). Cet effet anti-inflammatoire était aussi observé par la réduction d'un œdème induit par l'injection de carraghénane dans la patte de souris supplémentées pendant 14 jours avec l'hydrolysate (300mg/kg) (Saigusa *et al.*, 2015). L'activité anti-inflammatoire a aussi été mesurée dans différents hydrolysats de poisson. Un hydrolysate de co-produits de poisson plat présentait un effet anti-inflammatoire de manière dose dépendante (de 50 à 200 μ g/ml) dans des macrophages stimulés par LPS. Comme pour l'étude précédente, l'hydrolysate induisait une diminution de la production de NO et des cytokines TNF α , IL6, ainsi qu'une réduction de l'expression des gènes codant pour les protéines iNOS et COX2. Ces effets anti-inflammatoires étaient en partie dû à la suppression de la voie de signalisation NF- κ B (Choe *et al.*, 2016). Des résultats similaires ont aussi pu être observés sur des cellules humaines (kératinocyte, ostéoblaste et chondrocyte) grâce à l'utilisation d'un hydrolysate de collagène de poisson et d'hippocampe (*Hippocampus kuda*) (Subhan *et al.*, 2017; Ryu *et al.*, 2010). Hirose *et al.* (2017) ont aussi enregistré une diminution de l'expression des gènes TNF α et IL6, associée à une réduction de l'infiltration de macrophages M1 dans le tissu adipeux de souris obèses (diète HFHS) supplémentées par un hydrolysate de saumon. L'infiltration des macrophages de type M1 dans le tissu adipeux est un paramètre important dans le développement de l'inflammation chronique chez les patients atteints de MetS. Chevrier *et al.* (2015) ont aussi enregistré une diminution de l'infiltration de macrophages dans le tissu adipeux de souris LDLr^{-/-}/ApoB^{100/100} grâce à l'incorporation d'hydrolysate de saumon dans la diète (Tableau 1-5). De plus, une diminution des cytokines IL1 β , IL6, IL12, TNF α et TNF γ était aussi enregistrée dans le tissu adipeux viscéral. Les auteurs expliquaient ces

résultats par la présence de PB de faible poids moléculaires. Des conclusions similaires ont été reportées dans une étude chez des rats Wistar nourris avec une diète obésogène contenant des hydrolysats de différents poissons. Ainsi les auteurs enregistraient une diminution des cytokines IL6 et TNF α dans le tissu adipeux des groupes nourris avec un hydrolysate de maquereau, de hareng, de saumon et de bonite. Cependant, seul l'hydrolysate de saumon permettait une réduction de la prise de poids des rats ainsi que l'inhibition de l'activation de l'enzyme iNOS dans des macrophages stimulés par LPS (**Pilon et al., 2011**).

II.3. Hydrolysats et peptides bioactifs de poisson antioxydants

La génération de ROS entraîne un stress oxydatif chez les cellules qui vont alors se protéger grâce à l'action d'antioxydants (enzymatiques ou non) (**Harnedy et FitzGerald, 2012**). Cette réaction peut être initiée suite à une maladie (diabète, cancer), à un environnement stressant (polluants), ou à la dégradation des lipides (peroxydation) (**Harnedy et FitzGerald, 2012; Sila et Bougatef, 2012**). En effet, la production de ROS va être la première cause de la peroxydation des lipides membranaires et de la formation de malondialdéhyde (MDA). Les membranes cellulaires vont alors être plus perméables, et des transporteurs membranaires vont être inactivés par le MDA (**Ozata et al., 2002**). Pour maintenir leurs fonctions vitales, les cellules vont produire des molécules antioxydantes comme la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase. Il a ainsi été montré que les personnes obèses présentaient des concentrations en enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GPx) plus faibles que les personnes minces (**Ozata et al., 2002**).

Les peptides antioxydants peuvent présenter plusieurs actions pour réduire le stress oxydant. Ainsi, pour déterminer la capacité antioxydante d'un hydrolysate, il est généralement nécessaire d'analyser plusieurs systèmes radicaux suivant l'action recherchée, comme le 1,1-déphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) «free scavenging, hydroxyl radical scavenging», et les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS, «thiobarbituric acid reactive substances») (**Halim et al., 2016**). Par exemple, dans leur étude, **Bougatef et al. (2010)** ont étudié la capacité antioxydante d'un hydrolysate de sardinelle (*Sardinella aurita*) sur trois tests différents : (i) le DPPH qui mesure l'habilité d'une substance antioxydante à donner un proton afin de réduire le radical ; (ii) l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique (peroxydation) et (iii) le pouvoir réducteur qui mesure l'habilité d'un antioxydant à donner un électron ou un hydrogène afin de chélater le Fe³⁺ en Fe²⁺. Ainsi les auteurs ont identifié cinq séquences

peptidiques présentant des capacités de réduction du DPPH : Leu-Ala-Arg-Leu, Gly-Gly-Glu, Leu-His-Tyr, Gly-Ala-Trp-Ala et Gly-Ala-Leu-Ala-Ala-His. De plus les séquences contenant un résidu His présentaient les plus fortes activités, expliquées par la capacité de chélation et de piégeage des radicaux par le noyau imidazole de cet acide aminé (**Bougatef et al., 2010**). En effet, l'activité antioxydante des peptides est dépendante de leur séquence en AA. Ainsi, **Girgih et al. (2015)** ont reporté une augmentation des valeurs de DPPH et d'ORAC (capacité d'absorption des radicaux oxygénés, oxygen radical absorbance capacity) avec l'utilisation de fractions peptidiques issus d'un hydrolysats de cabillaud (*Gadus morhua*) contenant des AA hydrophobes et capables de donner des électrons (AA chargés négativement). De plus, certains acides aminés peuvent aussi directement éliminer les ROS dans le milieu, comme l'arginine, la citrulline, la glycine, la taurine et l'histidine (**Fang et al., 2002**). Des études *in vivo* ont aussi montré l'action bénéfique d'hydrolysats de poisson sur le stress oxydatif de rats obèses (**Nasri et al., 2015; Ktari et al., 2014**).

II.4. Peptides bioactifs de poisson cardioprotecteurs

La dyslipidémie est un paramètre important dans le développement de MCV qui est reconnue comme un facteur de risque pour les patients atteints de MetS. Des hydrolysats de poisson ont montré des habilités à réduire les TG et TC dans le foie et le plasma de modèles murins obèses (**Tableau 1**). De plus, la diminution de cholestérol LDL, VLDL et l'augmentation de HDLc ont aussi été rapportés par différentes études (**Tableau 1**). Tous les mécanismes d'actions des PB de poisson sur la dyslipidémie ne sont pas encore connus, mais quelques études ont pu en identifier. **Vik et al. (2015)** ont montré que le remplacement de 25% des protéines par différents hydrolysats de saumon chez des souris obèses modulait le métabolisme des lipides dans le plasma et le foie. La réduction des TG serait expliquée par la répression de la lipogenèse (baisse de l'expression des gènes *Fas* et *Acaca*) et par l'activation de l'oxydation des AG (augmentation de l'activité CPT-1) (**Vik et al., 2015**). La modulation des TG a aussi été enregistrée avec l'utilisation d'un hydrolysats de lieu noir qui permettait la production d'acide biliaire chez des rats, induisant ainsi l'oxydation des AG (**Liaset et al., 2009**). Ainsi, plusieurs auteurs ont montré que l'amélioration de la dyslipidémie chez des modèles murins obèses permettait une diminution de l'indice athérogène (ratio TG/HDL), et donc une diminution du risque

de MCV (**Ben Slama-Ben Salem et al., 2018; Jemil et al., 2017; Nasri et al., 2018**).

De plus, des hydrolysats de poisson ont aussi montré des effets sur la pression artérielle notamment par l'inhibition de l'enzyme convertissant l'angiotensine I (ACE, «angiotensin-converting-enzyme»). L'ACE est une enzyme cruciale dans la régulation de la pression artérielle périphérique. Elle permet la conversion de l'angiotensine I en octapeptide, vasoconstricteur très puissant, l'angiotensine II. Son inhibition permet la vasodilatation (hypotensive) des vaisseaux, et donc la diminution de la pression artérielle. De plus l'ACE agit aussi sur la dégradation de la bradykinine, un peptide permettant la réduction de la pression sanguine (**Li et al., 2004**). Des inhibiteurs de l'ACE ont été isolés dans différents hydrolysats de poisson : thon (*Thunnus sp*), saumon (*Salmo salar*), seiche (*Sepia officinalis*), bonite (*Scombridae sp*), sardine (*Sardina pilchardus*) et colin d'Alaska (*Theragra chalcogramma*) (**Halim et al., 2016; Balti et al., 2015; Byun et Kim, 2001**). **Nasri et al. (2013)** ont mesuré dans un hydrolysate de gobie (*Zosterisessor ophiocephalus*), un important pourcentage d'acides aminés aliphatiques (isoleucine, leucine, méthionine) qui seraient impliqués dans l'activité inhibitrice de l'ACE.

Les études ont ainsi montré l'influence de la composition en AA des peptides inhibiteurs sur leur interaction avec les sites actifs de l'ACE (**Fan et al., 2019; He et al., 2013**). Ainsi l'activité inhibitrice de tri- dipeptides était liée à la présence de tryptophane, phénylalanine, tyrosine ou proline en position C-terminal et d'AA branchés en position N-terminal (**He et al., 2013**). La taille du peptide est également un paramètre important dans l'activité inhibitrice de l'ACE. Ainsi, les peptides de faibles poids moléculaires (di ou tripeptides) pourraient se lier plus facilement avec le site actif de l'enzyme, le rendant inaccessible (**Fan et al., 2019; Pina et Roque, 2009**).

Des études *in vivo* ont aussi été menées afin d'évaluer l'activité antihypertensive de différents hydrolysats de poisson. La supplémentation du peptide Met-Ile-Phe-Pro-Gly-Ala- Gly-Gly-Pro-Glu-Leu (à 10mg/kg) provenant d'un hydrolysate de sole jaune (*Limanda aspera*) chez des rats présentant une hypertension, permettait une réduction de 11% de la pression artérielle. De plus, cet effet était maintenu pendant toute l'expérience (9h) et était similaire au contrôle chimique (Captopril®) (**Jun et al., 2004**). Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec un peptide (Gly-Leu-Pro) de peau de saumon du Pacifique (*Oncorhynchus keta*) et de thon (*Thunnus sp*) (Gly-Asp-Leu-Gly-Lys-Thr-Thr-Thr-Val-Ser-Asn-Trp-Ser-Pro-ProLys- Try-Lys-Asp-Thr-Pro)

chez des rats hypertendus à une dose de 20mg/kg et 10mg/kg respectivement (**Lee et al., 2010 ; Lee et al., 2014**). De plus, dans toutes ces études, une unique dose a été administrée aux rats, montrant l'efficacité des peptides de poisson. Une étude chez des individus présentant de l'hypertension a montré que l'administration d'un peptide d'hydrolysate de sardine (*Sardina pilchardus*) (Val-Tyr, 3mg/100g de boisson), permettait la diminution significative de la pression artérielle systolique et diastolique ainsi que l'augmentation de l'angiotensine I dans le plasma (**Bols et al., 1994**).

II.5. peptides bioactifs de poisson dans la sensibilité à l'insuline

Les hydrolysats de poisson sont connus pour leurs diverses applications (antioxydante, antimicrobienne, anticancer), mais depuis quelques années, des études ont démontré leur utilisation potentielle pour la prévention du développement du MetS. En effet, l'évolution a permis le développement d'une importante biodiversité des organismes marins aux caractéristiques uniques pouvant présenter des propriétés bénéfiques sur la santé humaine. Ainsi, différentes sources de protéines ont pu être identifiées pour la production d'hydrolysats modulant la sensibilité à l'insuline (**Tableau 1**). Certains hydrolysats de poisson permettent aussi la modulation de la prise de poids chez des rats soumis à une diète HFHS, souvent accompagnée d'une réduction du tissu adipeux (**Jemil et al., 2017 ; Nasri et al., 2015 ; Chevrier et al., 2015**). Les auteurs expliquent ces résultats non seulement par la présence de PB de satiété permettant la diminution de la prise alimentaire, mais aussi par l'activation de l'oxydation des AG dans le tissu adipeux viscéral par des PB (**Jemil et al., 2017; Liaset et al., 2009**). **Liaset et al. (2009)** ont rapporté que la taurine et la glycine, comprises en forte concentration dans un hydrolysate de lieu noir, permettaient la production d'acide biliaire menant à l'oxydation des AG.

La sécrétion de l'insuline par le pancréas est aussi activée par la «glucagon-like-peptide-1» (GLP-1) en réponse au glucose. Cependant, cette hormone peut être dégradée par la dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). Ainsi plusieurs inhibiteurs du DPP-IV ont été identifiés dans des hydrolysats de poisson. **Harnedy et al. (2018)** ont montré qu'une seule dose d'hydrolysate de merlan bleu (*Micromesistius poutassou*) chez des souris saines permettait l'amélioration de la tolérance au glucose grâce à la stimulation de la production d'insuline. De plus, les auteurs ont aussi évalué *in vitro* une augmentation de la sécrétion de GLP-1 et une inhibition de DPP-IV (IC50 : 1,28mg/ml), révélant la

présence de PB dans l'hydrolysats. Plusieurs séquences peptidiques inhibitrices du DPP-IV ont pu être identifiées dans diverses sources d'hydrolysats de poisson et notamment dans des peaux de poisson, riches en collagène. **Wang et al. (2015)** ont ainsi identifiés six séquences de deux hydrolysats différents. De plus, les hydrolysats de peau de poisson d'eau chaude (*Tilapia*, *Oreochromis niloticus*) montraient une activité inhibitrice plus importante que ceux d'eau froide (Flétan du Pacifique, *Hippoglossus stenolepis*), révélant l'importance de la source protéique dans la production de PB. **Neves et al. (2017)** ont aussi identifié plusieurs séquences peptidiques inhibitrices du DPP-IV dans des hydrolysats de peau de saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*). Cependant, les auteurs ont aussi montré que les AA Arg et Tyr présentaient des activités plus importantes seuls plutôt que les séquences de plusieurs AA. Ainsi la présence de certains AA semble importante pour l'activité inhibitrice du DPP-IV.

Le tableau 1 présente plusieurs hydrolysats de poisson qui permettaient la modulation du métabolisme du glucose, en diminuant sa concentration dans le plasma et en améliorant sa tolérance chez des rats obèses) (**Ben Slama-Ben Salem et al., 2018; Nasri et al., 2015; Ktari et al., 2013; Jemil et al., 2017**). Ces effets bénéfiques ont pu être mis en relation avec une amélioration de la production ou la signalisation de l'insuline. **Chevrier et al. (2015)** ont ainsi montré que le remplacement de 50% de caséine par un hydrolysats de saumon, permettait l'inhibition de la voie mTORC1/S6K1/IRS et donc une meilleure signalisation de l'insuline dans le foie. Les auteurs ont aussi mis en évidence une amélioration de la tolérance au glucose chez les souris obèses ainsi qu'une augmentation de la captation du glucose *in vitro* dans des cellules musculaires L6. La glycémie postprandiale est aussi modulée par les enzymes de digestion des glucides. L'enzyme α -amylase va réduire les glucides en oligosaccharides qui vont ensuite être digérés en maltose puis en glucose dans le tube digestif. L'inhibition de cette enzyme a montré une diminution de l'absorption du glucose et donc une diminution de la glycémie postprandiale chez les patients diabétiques (**McCue et al., 2005**). Plusieurs études évaluant l'effet hypoglycémique d'hydrolysats de poisson ont ainsi mesuré une inhibition de l'activité de l' α -amylase, ceci pouvant expliquer la diminution de concentration de glucose dans le plasma (**Tableau 1**) (**Ben Slama-Ben Salem et al., 2018; Nasri et al., 2015; Ktari et al., 2013; Jemil et al., 2017**).

Tableau 1: Études in vivo utilisant des hydrolysats de poisson sur l'évolution de paramètres impliqués dans le développement du MetS.

Source hydrolysat	Protéine	Modèle	Diète	Durée	Dose	Activité
Poulpe (<i>Octopus vulgaris</i>)	Muscle	Rat Wistar alloxénique mâle	NI	30 jours	400mg/kg	Plasma : ↓ α -amylase activité, lipase activité, Glc, HbA1c, TC, TG, LDLc ; ↑Ins, HDLc Foie : ↓TC, TG, LDLc ; ↑Gly ↓ AUC oGTT ↓ AI
Poisson Gobi (<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>)	Muscle	Rat Wistar mâle	HFHF	10 semaines	400mg/kg	Plasma: ↓ α -amylase activité, Glc Foie : ↓Gly, MDA ; ↑CAT, GPx, SOD, GSH
Blennie-basilic (<i>Salaria basilisca</i>)	Muscle	Rat Wistar alloxénique mâle	Std	3 semaines	400mg/kg	Plasma : ↓ α -amylase activité, lipase activité Glc, HbA1c, TC, TG, LDLc ; ↑HDLc Foie : ↓TC, TG, LDLc ; ↑HDLc
Sardinelle (<i>Sardinella sp.</i>)	Muscle	Rat Wistar mâle	Hypercal-orique	10 semaines	400mg/kg	Plasma : ↓ α -amylase activité, Glc, TC, TG, LDLc, VLDLc ; ↑HDLc Foie : ↓Gly, MDA ; ↑CAT, GPx, SOD, TC, TG ↓AI, GPc
Merlan Bleu (<i>Micromesistius poutassou</i>)	Muscle	Souris NIH Swiss	NI	1 jour	100mg/kg	↓ AUC oGTT ; ↑Ins
Saumon de l'Atlantique (<i>Salmo salar</i>)	Muscle	Souris C57BL/6J	HF	6 semaines	25% des protéines	↓GPc Plasma : ↓TG ; ↑HDLc, PHI Foie : ↓ fatty acid synthase, TG, AGMI ; ↑PHI, AGPI ω -3
Poisson Gobi (<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>)	Muscle	Rat Wistar mâle	HFHF	10 semaines	400mg/ml	Plasma : ↓TC, TG, LDLc, VLDLc ; ↑HDLc Foie : ↓TC, TG ↓AI, GPc

II.6. Peptides antihypertenseurs

Des peptides antihypertenseurs ont été identifiés dans de nombreux hydrolysats de poissons, mollusques et crustacés. L'un des principaux mécanismes est l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Cette enzyme joue un rôle dans la régulation de la pression sanguine en catalysant la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, un agent vasoconstricteur, et en inactivant la bradykinine qui est un agent vasodilatateur (Erdös et Skidgel, 1987).

Les peptides inhibiteurs de l'ECA peuvent être compétitifs et se lier au site actif pour empêcher la liaison du substrat ou modifier la conformation spatiale de l'enzyme (Zhao *et al.*, 2009). Il peut également s'agir d'inhibiteurs non-compétitifs (Qian *et al.*, 2007). L'activité de plusieurs peptides a également été démontrée *in vivo* chez des rats spontanément hypertendus. Ainsi l'administration orale du peptide GDLGKTTSVNWSPPKYKDTP, isolé d'un hydrolysate de thon, à 10 mg/kg diminue la pression systolique chez ces rats. L'activité est similaire à celle du Captopril, un médicament contre l'hypertension. Ces peptides constituent une alternative intéressante aux molécules synthétiques commercialisées (Lee *et al.*, 2010).

II.7. Description de l'espèce étudiée

II.7.1. Position systématique, morphologie

❖ Systématique

Embranchement : Mollusca

Classe : Cephalopoda

Sous classe : Coleoidea

Ordre : Octopoda

Sous-ordre : Incirrina

Famille : Octopodidae

Genre : Octopus

Espèce : Octopus vulgaris

Noms vernaculaires français : pieuvre, poulpe.



Figure 8. : *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797

❖ **Principaux caractères morphologiques**

Le manteau de la pieuvre commune mesure jusqu'à 25 cm de longueur, les bras jusqu'à un mètre de long. Son poids à taille adulte avoisine les huit kilogrammes.

La pieuvre a un siphon juste derrière la tête sur un côté de son manteau (**figure9**) qu'elle utilise de trois façons : fréquemment pour rejeter l'eau quand ses branchies en ont prélevé l'oxygène ; et occasionnellement soit pour s'enfuir en déchargeant rapidement de l'eau pour se propulser, soit pour jeter un nuage d'encre afin de dérouter l'ennemi (**Beauvais et al; 2016**).

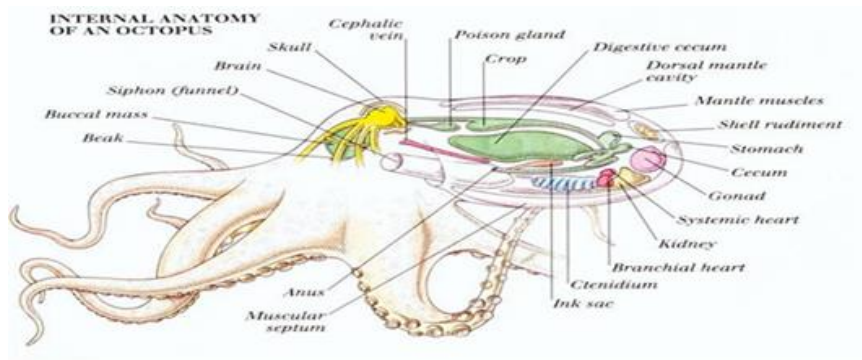


Figure 9: vue latérale interne de l'*Octopus*

Partie II :
Partie Pratique

Chapitre III :

Matériels et Méthodes

CHAPITRE III : Matériel et Méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université de Mostaganem, la partie d'anatomie pathologique a été réalisée au service d'anapth à l'hôpital Che Guevara de Mostaganem.

III.1. Matériel

III.1.1. Echantillon

Dans ce présent travail, on s'est intéressé à l'évaluation des propriétés thérapeutique des peptides bioactifs extraits à partir du poulpe sur un modèle animal (rats Wistar) .

III.1.2. Modèle animal

Nous avons utilisé des rats Wistar femelles issues de l'institut pasteur d'Alger (I.P.A.), pesant entre 80g et 100g au début de l'expérimentation. Les rats ont été soumises à une période d'adaptation de sept jours où elles ont un accès libre à l'eau et à l'aliment sous des conditions de lumière et de température contrôlées (**figures 10 et 11**).



Figure 10 : Conditions d'élevage.



Figure 11: Modèle animal étudié.

III.2. Méthodes

A. Préparation de l'extrait du poulpe

200g de poulpe ont été broyés avec 500mL d'eau distillée (**figure 12**), ensuite le mélange a été agité pendant 24h à température ambiante (**figure 13**). A la fin d'agitation, l'extrait du poulpe a été filtré par un papier filtre Wattman n° 1 (**figure 14**), et le filtrat a été collecté dans des tubes à essais de 5mL puis centrifugé à 4000 tours pendant 15 min pour récupérer le surnageant qui a été conservé au congélateur (**figure 15**).



Figure 12 : Broyage du poulpe.



Figure 13 : Agitation du poulpe.



Figure 14 : Filtration de l'extrait



Figure 15 : Collecte de l'extrait

B. Conception de l'étude

Après deux semaines d'adaptation, les animaux ont été pesés et 7 lots ont été constitués et marqués : (témoin positif, témoin négatif, lot de référence, deux tests curatifs de 100 mL/kg et 400mL/kg , deux tests préventifs à 100mL/kg et 400 mL /kg).

C. Induction de la colite

La colite a été induite par l'acide acétique selon le protocole décrit par Rohit Gupta et al. (2015), avec de légères modifications, les rats ont été légèrement anesthésiés avec l'acépromazine par voie intra-péritonéale et une sonde intra-rectale lubrifiée a ensuite été introduite soigneusement a 2 ou 3 cm dans le colon via l'anus après avoir fixé les rats en position trendelenburg . 150 μ l de la solution d'acide acétique à 5% (V/V, dans le sérum salé à 0.9%) a été instillée dans la lumière du colon. Les animaux sont ensuite maintenus dans une position de tête en bas pendant 30 s pour limiter l'expulsion, pour permettre une distribution uniforme de la solution (**figure 16**).



Figure 16 : Induction de la colite par l'acide acétique.

D.Traitement des rats

Les rats sont réparties en 7 lots de 5 rats. L'identification individuelle des rats se fait par la coloration au niveau de la queue (**figure 17**) Le poids a été enregistré pendant la durée de l'expérimentation : le traitement a été réalisé, pour une période de 7 jours.

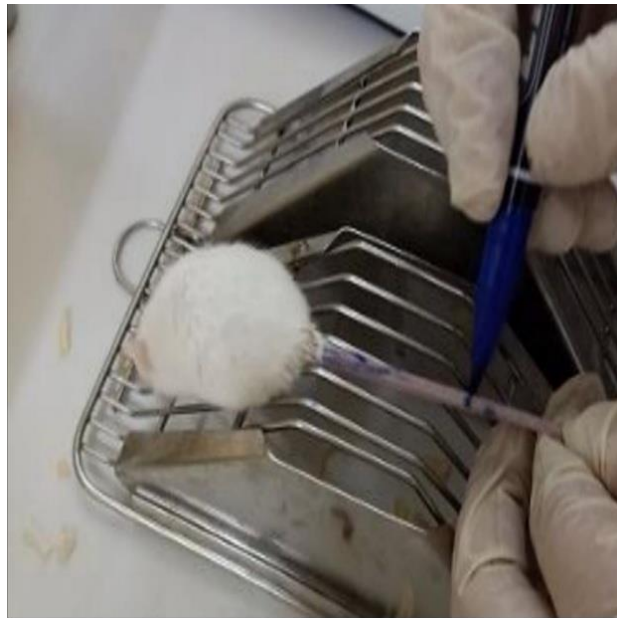


Figure 17 : Identification des rats.

La division des lots a été faite comme suit :

- **Lot 1** (Témoin négatif) : les rats n'ont rien reçu.
- **Lot 2** (Témoin positif) : les rats de ce lot reçoivent par voie rectale une dose de 5mg/kg d'acide acétique.
- **Lot 3** (préventif 100 mg/kg): les rats de ce lot reçoivent d'abord 100 mg/kg d'extrait de poulpe pendant 7 jours par gavage, puis elles subissent une injection d'acide acétique le dernier jour.
- **Lot 4** (préventif 400 mg/kg): Les rats de ce lot reçoivent d'abord 400 mg/kg d'extrait de poulpe pendant 7 jours par gavage, puis elles subissent une injection d'acide acétique le dernier jour.
- **Lot 5** (curatif 100mg/kg) : Les rats de ce lot reçoivent une injection d'acide acétique le premier jour, et puis un gavage quotidien de 100mg/kg d'extrait de poulpe pendant 7 jours .
- **Lot 6** (curatif 400mg/kg) Les rats de ce lot reçoivent une injection d'acide acétique le premier jour, puis un gavage quotidien de 400mg/kg d'extrait de poulpe pendant 7 jours .
- **Lot 7** : les rats de ce lot reçoivent une injection d'acide acétique, puis un gavage quotidien de 500 mg/kg d'un médicament pharmaceutique (SULFASALAZINE).

L'évolution pondérale des rats a été suivie dès le début de l'expérimentation et les rats furent pesés tous les jours (7j/7).

III.3. Observations générales et score clinique

La mesure du poids corporel et la température des rats, la consistance des selles (Dure, molle, diarrhée, diarrhée aqueuse, diarrhée muqueuse, diarrhée hémorragique, muco hémorragique...), et les saignements (Epistaxis, rectorragie, hémorragie générale, otorragie, érythème rectale, irritation), le comportement, état général de l'animal et douleur pour chaque lot ont été surveillés quotidiennement afin d'évaluer l'effet de l'extrait du peptide du poulpe en comparant avec les autres lots.

a. la variation de la perte de poids corporel

La variation de perte de poids corporel est explicitée dans le **tableau 2**.

Tableau 2: la variation de la perte de poids corporel.

	1	2	3	4	5	6	7
Score	Variation de la perte de poids corporel						
1	+	+	+	+	-	-	-
2	+	-	+	+	-	-	-
3	+	-	+	+	-	-	-
4	+	-	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+	+

b. Score de la consistance des selles

Le score de la consistance des selles est présenté dans le **tableau 3**

Tableau 3 : Score de la consistance des selles.

Score Selles	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7
1	Selles normales ou dures	Selles molles	Selles normales	Selles normales	Selles molles	Selles molles	Selles molles
2-3	Selles molles	Diarrhée	Selles normales	Selles normales	Diarrhée	Diarrhée	Diarrhée
4-7	Diarrhée	Diarrhée	Selles normales	Selles normales	Selles normales	Selles normales	Selles normales

c. Score des saignements

Le Score des saignements est présenté dans le **tableau 4**

Tableau 4 : Score des saignements.

Score des saignements	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7
1	Pas de saignement	Saignement important	Pas de saignement	Saignement important	Saignement important	Saignement important	Saignement important
2-3	Pas de saignement	Saignement léger	Pas de saignement	Pas de saignement	Saignement léger	Saignement léger	Saignement léger
4-7	Pas de saignement	Saignement léger	Pas de saignement	Pas de saignement	Pas de saignement	Pas de saignement	Pas de saignement

III.4. Sacrifice et prélèvement du sang et des organes

A la fin de la période du traitement, les animaux sont mis à jeun pendant une nuit. Ensuite ils sont sacrifiés par décapitation (**figure 18**). Le sang a été immédiatement recueilli dans deux tubes EDTA destiné au dosage des paramètres hématologiques (**figure 19**). Après la dissection, Le colon et l'intestin sont attentivement prélevés, rincés avec l'eau physiologique et ensuite pesé e et conservés dans du formol à 10% .



figure 18 :Sacrifice des rats.

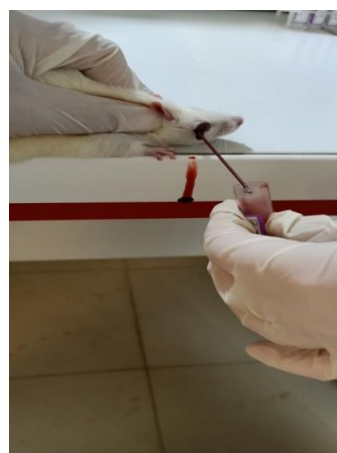


figure 19: Prélèvement du sang

III.5. Étude histologique des organes

Le colôn et l'intestin ont été l'objet d'une étude macroscopique et microscopique.

III.5.1. Étude macroscopique

-Réalisation des fragments pour chaque organe (**Figure 20.a**).

-Introduction de ces fragments dans des cassettes d'inclusion, les cassettes ont été marquées sur leur bord (**Figure 20.b**).

-Placement des cassettes dans un flacon de formol à 10%.



(a)



(b)

Figure 20 :Réalisation des fragments.

III.5.2.Étude microscopique

A.La circulation (déshydratation)

Cette étape a pour objectif de remplacer l'eau contenu dans les tissus par de la paraffine. La « paraffine » (**Figure21**), au sens histologique du terme, est un mélange d'hydrocarbures saturés et quelquefois de cires. Son intérêt est d'être chimiquement neutre, soluble dans de nombreux solvants et facile à couper au rasoir. La paraffine n'étant pas miscible à l'eau, les pièces fixées devront être déshydratées dans des bains d'alcools à degrés croissants puis dans du xylène et

pour finir dans de la paraffine chauffée à son point de fusion (+ 1 ou 2°C). La durée du cycle de déshydratation dépend de la nature des échantillons et de leur taille.

La déshydratation contient quatre étapes :

a. La post-fixation : c'est une étape qui permet de compléter la fixation

Bac 1 : Formol à 10% durant deux heures

b. La déshydratation.

Bac 2 : Alcool blanc 70° durant deux heures

Bac 3 : Alcool blanc 85° durant deux heures

Bac 4 : Alcool blanc 90° durant deux heures

Bac 5 : Alcool blanc 100° durant deux heures

c. La clarification : est une étape intermédiaire qui permet d'avoir une bonne imprégnation.

Bac 6 : Xylène ou toluène durant deux heures

Bac 7 : Xylène ou toluène durant deux heures

Bac 8 : Xylène ou toluène durant deux heures



Figure 21 : : Automate (Leica) de la circulation (déshydratation).

B. Inclusion et enrobage

L'enrobage consiste à préparer un bloc de paraffine dans lequel on introduit une pièce de tissu qui a subi les étapes de circulation. L'enrobage permet de fournir au tissu un support externe pour la coupe au microtome et d'assurer une meilleure conservation du tissu par la suite.

L'inclusion est faite par un appareil muni d'un compartiment alimenté en chaleur pour faire couler la paraffine et d'une plaque refroidissante sur laquelle est mis un moule métallique contenant des cassettes où les pièces couvertes de paraffine liquide, elles sont laissées refroidir sur une plaque à froid, ainsi on obtient les blocs qui seront utilisés pour donner de fines coupes. Les blocs sont conservés au froid jusqu'à la coupe de pièces (**Figure 22**).



Figure 22: Appareil à paraffinage.

C. La microtomie (La coupe)

On isole ensuite des coupes dans le bloc de paraffine, on utilise pour cela un microtome qui fait avancer le bloc sur un rasoir, le bloc avance d'environ 2 à 3 μm à chaque fois. L'ensemble des tranches vont former un ruban dans lequel on retrouve des coupes sériées de prélèvement tissulaire (**Figure 23**).



Figure 23 : La microtomie.

D.Étalement et la préparation des lames

On met une goutte d'eau albuminé sur la lame ensuite on pose le ruban sur la lame et on la met sur une plaque chauffante pour avoir un bon étalement et éviter la formation des plis.

On trempe les lames dans le xylène ou toluène pour le déparaffinage, ensuite elles sont incubées jusqu'au séchage.

E.La Coloration

La coloration utilisé dans l'anatomie pathologie c'est la coloration HE : Hématoxyline Eosine,

L'hématoxyline pour colorer le noyau et l'éosine pour le cytoplasme. Les échantillons sont traités par plusieurs produits et dans plusieurs bacs (**Figure 24**) comme suit :

Bac 1 : Alcool blanc 90° durant cinq minutes

Bac 2 : Alcool blanc 60° durant cinq minutes

Bac 3 : Alcool blanc 50° durant cinq minutes

Bac 4 : solution de lavage

Bac 5 : Hématoxyline durant cinq minutes

Bac 6 : Eau acidifié durant dix secondes

Bac 7 : Carbonate de lithium dix secondes

Bac 8 : Rinçage

Bac 9 : Eosine durant cinq minutes

Bac 10 : Alcool blanc durant deux minutes

Bac 11 : Toluène durant deux minutes



Figure 24 : Les bacs de la coloration HE (Hématoxyline Eosine).

F.Le montage

Les lames sont montées pour préserver les colorations. Une goutte de solution (EUKITT) est déposée permettant l'adhésion sur la lame, en présence d'une lame propre et sèche en inclinant progressivement cette dernière de façon que la solution s'étendue peu à peu et recouvre la coupe sans emprisonner les bulles d'air. Puis on colle des lamelles par-dessus afin de préserver les préparations. Les ainsi montés peuvent être conservés pendant plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années (**Figure 25**) .



Figure 25 : Les lames après la coloration.

G.Lecture microscopique

La lecture est réalisée par un photo-microscope et chaque coupe est photographiée (**Figure 26**).

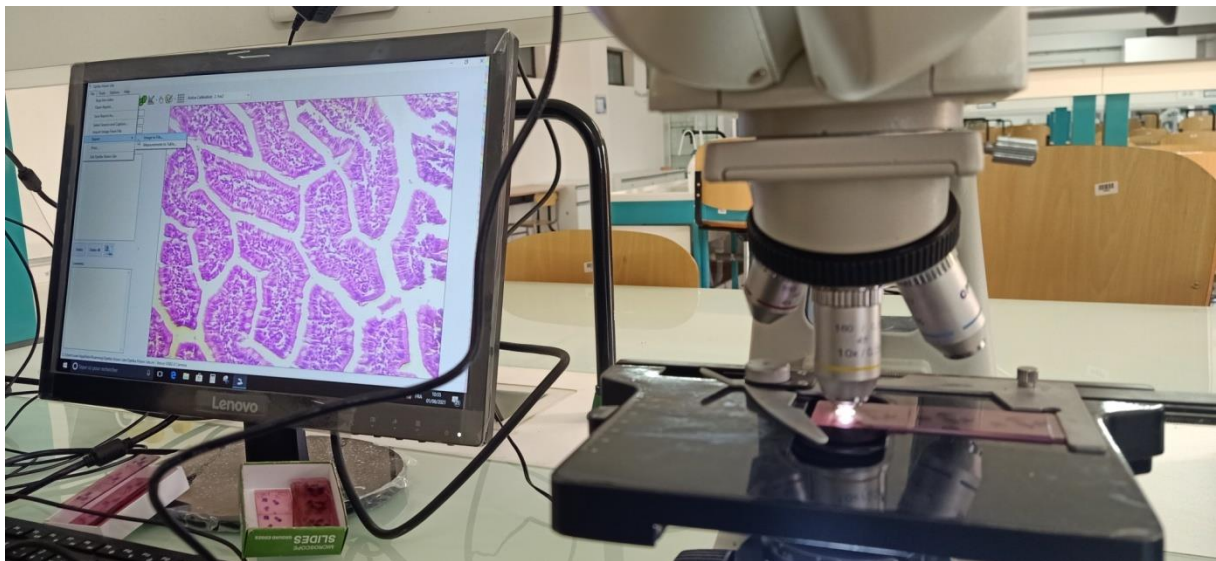


Figure 26 :Observation microscopique et prise de photo.

Chapitre IV :
RESULTATS
ET
DISCUSSION

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

La présente étude consiste à mettre en exergue l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de peptides bioactifs du poulpe pour explorer ses effets protecteurs possibles dans le modèle expérimental de la colite induite par l'acide acétique chez les rats Wistar.

IV.1. Observations générales et scores cliniques

Les observations montrent que les rats des groupes traités à l'acide acétique ont développé une rectocolite hémorragique, et les signes typiques : diarrhée et chez certains rats une diarrhée sanglante, une diminution de la mobilité et de la consommation de nourriture, perte du poids corporel, un saignement à partir de l'anus (rectorragie). Cependant ces signes physiopathologiques ne sont pas révélés chez le groupe témoin, chez les deux groupes expérimentaux du test curatif ayant subi un gavage quotidien de 100mg /Kg et 400 mg/kg respectivement ainsi que chez les deux groupes du test préventifs ayant reçu les même doses de peptides bioactifs du poulpe pendant sept jours avant l'introduction de l'acide acétique. On remarque que ces rats présentent des aspects physiologiques sains. Ce qui confirme l'efficacité du traitement donné. Ceci mentionne l'existence de nombreuses similitudes entre la RCH induite par l'agent ulcérogène avec la RCH humaine, y compris la diarrhée, la rectorragie, les excréments sanguins et les ulcères du côlon (Najafi et al., 2016) .

IV.2. Evolution pondérale

La rectocolite hémorragique comme un type de maladie inflammatoire chronique de l'intestin est associée à une perte accrue de poids (Hammond, 2015). Dans cette recherche, une chute de poids a été observée dans tous les lots ayant reçu l'acide acétique par rapport au groupe contrôle (Témoin) de la RCH. Une diminution de la consommation de la nourriture a été observée cela est due à la perte d'appétit ce qui justifie la perte de poids chez les rats.

Les résultats de l'évolution pondérale des groupes de rats sont illustrés dans la figure 27. Après une phase de perte de poids (J3-J4) chez les rats traités par l'extrait de

peptide du poulpe, un gain de poids a été observé après le 3 -ème jours du traitement par les peptides de poulpe à des doses de 100 et de 400 mg/kg.

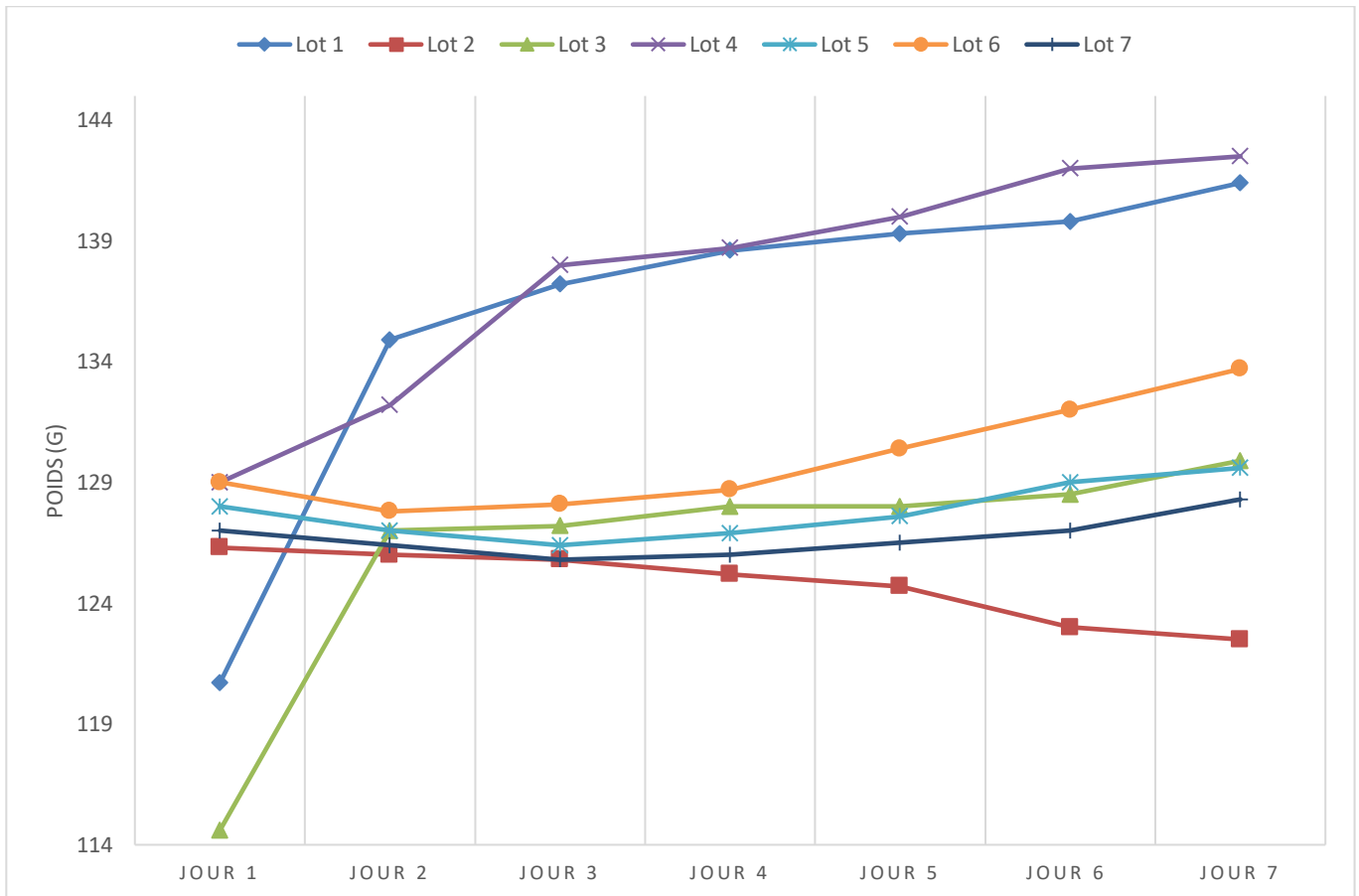


Figure 27 : effets des peptides du poulpe et sulfasalasine et l'acide acétique sur l'évolution pondérale des rats. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM.

IV.3.Consistance des selles

Après l'administration de l'acide acétique nous avons remarqué une modification de la consistance des selles allant des selles normales vers une diarrhée chez tous les lots ayant reçu l'acide acétique, cependant aucun des changements décrits ont été observés dans le groupe normal témoin. Toutefois, ces diarrhée ont été modérées chez les lots traités avec l'extrait du poulpe à des doses de 100 et 400 mg/kg respectivement, avant et après l'induction de la colite (préventif et curatif).

Les rats de ce lot présenté une augmentation fréquente de la diarrhée avec du sang et du mucus durant la durée de l'expérimentation. Cela est dû aux effets dommageables directs de l'acide acétique sur la paroi intestinal ainsi qu'aux altérations de la fonction

épithéliale par les produits libérés par les mastocytes activés. (Ghatule et Shalini, 2012).

IV.4.Saignement

Les résultats qui illustrent le saignement sont présentés dans les figures 28 et 29. Les rats recevant l'acide acétique ont montré, en plus de la diarrhée un saignement à partir de l'anus (rectorragie) ceci est dû à la vasodilatation des vaisseaux sanguins sous l'effet de l'acide acétique induit à une augmentation du débit sanguin provoquant un saignement à travers l'anus. Un érythème. Ce saignement n'a pas été observé chez les rats des lots expérimentaux des tests préventif et curatif traités avec 100 et 400 mg/kg d'extrait de poulpe.



Figure 28 : Réctorragie.



Figure 29 : érythème.

IV.5. Scores macroscopiques

L'augmentation du poids du colon après l'instillation intrarectale d'acide acétique indique la présence d'un œdème et d'une inflammation. Cette conclusion a été mentionnée plusieurs auteurs qui ont induit la RCH par l'acide acétique (Giriş *et al.*, 2008).

Le rapport poids/longueur du côlon est considéré comme un indice de l'inflammation et de l'œdème (Dodda *et al.*, 2014). Selon l'enquête réalisé par Guazelli *et al.* (2013), L'administration intracôlonique d'acide acétique induit une augmentation significative de l'œdème du côlon par l'augmentation du rapport poids/ longueur. (Guazelli *et al.*, 2013) (Tableau 5).

Tableau 5 : Effets des peptides du poulpe, de la sulfasalazine et de l'acide acétique su la longueur et le poids des côlons des rats .

Lots	Longueur (Cm)	Poids (g)
Lot 1	13,5	1,592
Lot 2	14,6	2,363
Lot 3	14,2	1,498
Lot 4	14	1,801
Lot 5	14,3	1,919
Lot 6	13	1,716
Lot 7	14	1,718

D'après les analyses statistiques une différence très hautement significative ($p > 0.05$) été enregistrée entre la longueur du côlon des rats de lot témoin positif et du côlon des rats lot témoin négatif . De même une différence très hautement significative ($p > 0.05$) a été enregistré entre la longueur du côlon des rats du lot essai et la longueur du côlon des rats lot témoin positif.

Cependant une différence hautement significative ($p > 0.05$) a été enregistré entre la longueur du côlon des rats du lot témoin positif et celle du lot de référence, de la même manière aucune différence significative ($p < 0.05$) n'a été enregistrés entre la longueur du côlon des rats de lot essai et du lot de référence, indiquant l'effet curatif des peptides du poulpe sur la colite ulcéreuse.

Conformément aux conclusions ci-dessus, la présente étude a démontré que l'instillation intrarectale d'acide acétique provoquait des inflammations œdémateuses macroscopiques très graves dans le côlon et un raccourcissement du côlon dus à une nécrose.

L'action ulcéreuse de l'acide acétique réside sur l'induction des dommages sévères au niveau de la barrière épithéliale, Il a été prévu que la forme protonée de l'acide libère des protons

dans l'espace intracellulaire, ce qui peut provoquer une acidification intracellulaire massive entraînant d'immenses dommages épithéliaux (**Randhawa et al., 2014**). De même L'administration intrarectale d'une solution diluée d'acide acétique provoque une inflammation, il a été montré que l'inflammation du côlon est une réponse immunitaire locale intense caractérisée par une augmentation d'infiltration des neutrophiles dans le tissu intestinal, l'œdème, l'ulcération et la nécrose (**Jurjus et al., 2014**). Le score des dommages macroscopiques était parmi les principaux paramètres pour évaluer le degré d'inflammation du côlon dans la maladie inflammatoire de l'intestin (**Niu et al., 2013**).

IV.6. Paramètres hématologiques

Les résultats de L'FNS des rats sont présentés dans le tableau 6. Les données illustrent l'FNS des rats témoins et des rats traitées avec l'extrait des peptides du poulpe avec 2 concentration différentes (100 et 400mg/kg) avant l'induction de la colite pour les lots préventifs et après son induction pour les lots curatifs et des rats traitées avec sulfasalasine.

On remarque que chez les rats ayant reçu l'acide acétique seulement l'augmentation du taux des globules blancs et une diminution des plaquettes sanguines par rapport aux rats des lots traités par l'extrait du poulpe et par la sulfasalasine. En outre, les résultats obtenus affichent une diminution des globules rouges, de l'hémoglobine, des hématocrites.

En effet, on constate que les paramètres ont été optimisés chez les rats des lots expérimentaux des test préventifs et curatifs, la différence est significative entre les rats ayant reçu 100 mg/kg et 400 mg/kg , ce qui suggère que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait du poulpe est dose-dépendant.

Tableau 6 : les résultats de FNS des rats témoins et des rats traitées avec l'extrait des peptides du poulpe et des rats traitées avec sulfasalazine.

Test	Résultat							Valeur de référence
	NUMERATION FORMULE SANGUINE (SYSMEX-XT 4000 i)							
	Numération sanguine							
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	
Globule Blancs	12000	1980mm	7009	8260	6740 mm	7730	11720	6000 à 18000
Globule Rouges	7720000	7790000 mm	76300000	7800000	6670000 mm	7700000	7270000	
Hémoglobine	13,4	15.2g/dl	13,2	12.6	13,2g/dl	13	14	9,5 à 14
Hématocrite	39	46	36	40	39,2	40,6	38	29 à 41
VGM	62	59	65	63	60.9	57.3	57.8	68 à 108
TCMH	27	19.5 pg	19	20	19.8	19.6	19.3	24 à 35
CCMH	31	33 g/dl	32	33,4	32.5g/dl	34.2	33.3	30 à 36
VPM	8	8.1 fL	7	7.6	7.8	7.6	7.5	8 à 15
EQUILIBRE LEUCOCUTAIRE								
Neutrophiles	21	0.8	5	19.2	3	6	25.2	30 à 60
Neutrophiles(#)	300	70 mm	790	775	200	450	2960	1000 à 6000
Lymphocytes	66	79.1	80	65	74.9	88.9	65.7	40 à 60
Lymphocytes (#)	6400	6800mm	5200	6000	5050	6880	7700	4000 à 12000
Basophile	0.5	1.1	0.6	0.8	0.7	0.5	0.4	0 à 1
Basophile (#)	74	81	50	70	66	48	33	0 à 100
Eosinophiles	2,9	3.9	3,2	3	2.8	1.9	1.1	0 – 4
Eosinophiles (#)	400	359 mm	255	300	254	177	77	100 à 1000
Monocytes	12	24.2	12,3	14	18.6	2.7	7.6	0 à 9
Monocytes (#)	300	2163 mm	989	1118	1679	287	623	200 à 1200
Plaquettes	400000	894000	360000	302000	422000	372000	49000	200000 à 550000

IV.7. Scores histologiques

A l'étude microscopique des coupes histologique au niveau du côlon, on a observé des côlons sains pour toutes les rats des lots traités par des concentrations de 100 et 400 mg/kg d'extrait des peptides du poulpe pendant la période expérimentale 7 jours , cependant, on a observé une inflammation entre la paroi et les cellules du côlon pour les rats non traitées le lot des témoins négatifs (**Figure 30**).

Les résultats illustrés ci-dessous affichent un tissu enflammé et une necrose pour le lot 2 recevant l'acide acétique seulement, par contre les coupes histologiques des colons des autres lots traités n'affichent aucune anomalie en compraison avec le lot 7 traité par la sulfasalazine.

La couche de mucus est la première ligne de défense physique que rencontrent les molécules externes lorsqu'elles arrivent dans la lumière intestinale, et qui empêche les bactéries d'entrer directement en contact avec les cellules épithéliales (**Buckley et Turner, 2018**). Les principaux éléments constitutifs de la couche de mucus sont des protéines mucines donc l'expression de mucine est essentielle dans la protection contre la colite ulcéreuse. **Vander Sluis et al. (2006)** montrent que la carence en Muc2 conduit à une inflammation du côlon et contribue à l'apparition et à la perpétuation de la colite expérimentale . Les polysaccharides d'encre de sépia (SIP) sont capables d'augmenter les quantités de cellules caliciformes chez les souris pour exprimer plude mucines (**Zuo et al., 2015**).

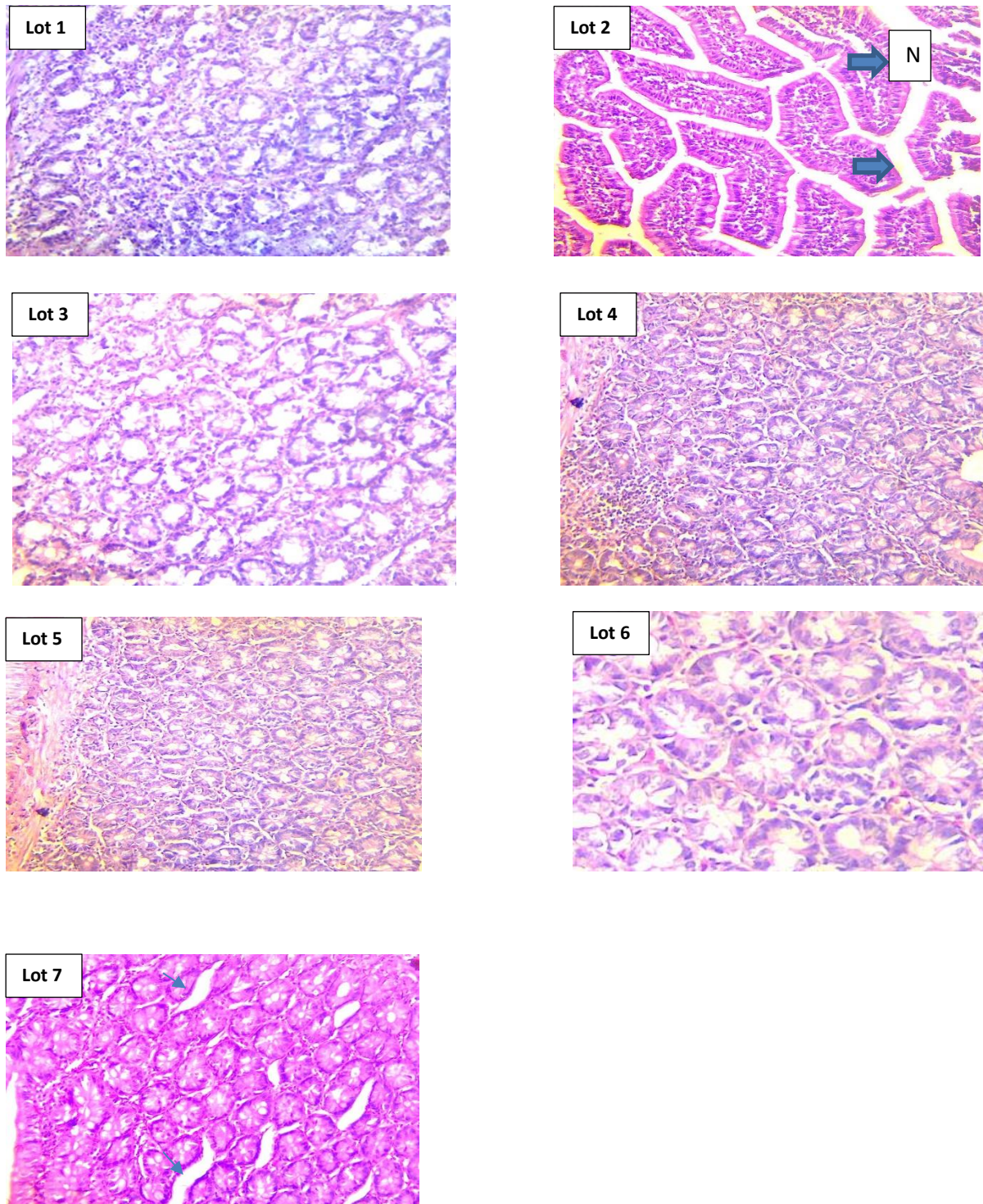


Figure 30: Coupes histologiques des colons des différents lots expérimentaux

CONCLUSION

Conclusion

La colite intestinale est devenue un problème de santé publique, du fait de leur incidence et prévalence augmentées dans le monde entier.

Notre étude avait pour objectif d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait des peptides du poulpe sur la colite intestinale induite par l'acide acétique.

La colite se caractérise par une modification de la consistance des selles pouvant aller jusqu'à la diarrhée hémorragique et l'apparition de saignements rectaux, une diminution de la consommation alimentaire des animaux associée à une perte du poids corporel, présence des signes de douleur et un mauvais état général.

Les résultats de notre étude ont révélé que le traitement des rats par les peptides du poulpe a permis de limiter ces signes cliniques.

Enfin, il sera intéressant à l'avenir d'envisager des études plus approfondies pour mettre en évidence plus de détails sur cet effet.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- **Balti, R.; Bougatef, A.; Sila, A.; Guillochon, D.; Dhulster, P.; Nedjar-Arroume, N.**, Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* **2015**, *170*, 519-525.

- **Bols, N. C.; Barlian, A.; Chirinotrejo, M.; Caldwell, S. J.; Goegan, P.; Lee, L. E. J.**, Development of a cell-line from primary cultures of rainbow-trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases* **1994**, *17* (6), 601-611.

- **Byun, H. G.; Kim, S. K.**, Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry* **2001**, *36* (12), 1155-1162.

- **B. R. R. De Mattos et al.**, “Inflammatory bowel disease: An overview of immune mechanisms and biological treatments,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015, doi:10.1155/2015/493012.

- **B. Khor, A. Gardet, and R. J. Xavier**, “Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease,” *Nature*, vol. 474, no. 7351, pp. 307–317, 2011.

- **Buckley and J. R. Turner**, “Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, no. 1, 2018.

- **Ben Slama-Ben Salem, R.; Ktari, N.; Bkhairia, I.; Nasri, R.; Mora, L.; Kallel, R.; Hamdi, S.; Jamoussi, K.; Boudaouara, T.; El-Feki, A.; Toldra, F.; Nasri, M.**, In vitro and in vivo anti-diabetic and anti-hyperlipidemic effects of protein hydrolysates from *Octopus vulgaris* in alloxanic rats. *Food Research International* **2018**, *106*, 952-963.

- **Bougatef, A.; Nedjar-Arroume, N.; Manni, L.; Ravallec, R.; Barkia, A.; Guillochon, D.; Nasri, M.**, Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry* **2010**, *118* (3), 559-565.

- **Chevrier, G.; Mitchell, P. L.; Rioux, L. E.; Hasan, F.; Jin, T. Y.; Roblet, C. R.; Doyen, A.; Pilon, G.; St-Pierre, P.; Lavigne, C.; Bazinet, L.; Jacques, H.; Gill, T.; McLeod, R. S.; Marette, A.**, Low-Molecular-Weight Peptides from Salmon Protein Prevent Obesity-Linked Glucose Intolerance, Inflammation, and Dyslipidemia in LDLR-/-/ApoB(100/100) mice. *Journal of Nutrition* **2015**, *145* (7), 1415-1422.

- **Choe, I. H.; Jeon, H. J.; Eom, S. H.; Han, Y. K.; Kim, Y. S.; Lee, S. H.**, The anti-inflammatory effect of a glycosylation product derived from the high hydrostatic pressure enzymatic hydrolysate of a flatfish byproduct. *Food & Function* **2016**, *7* (6), 2557-2565.

- **Chalamaiah, M.; Kumar, B. D.; Hemalatha, R.; Jyothirmayi, T.**, Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry* **2012**, *135* (4), 3020-3038.

- **C. Gower-rousseau and C. G. Epid**, “Epid émiologie des maladies inflammatoires chroniques de l’Intestin en France : apport du registre EPIMAD To cite this version :,” 2013.

- **C. F. S. Guazelli et al.**, “Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms,” *J. Nat. Prod.*, vol.76, no. 2, pp. 200–208, 2013.

- **Damouche, N. Boumansour, H. Boukhari, K. Reguieg, R. Tedjani, and N. Midoun**, “Aspects épidémiologiques de la maladie de Crohn dans la région de l’Oranie, Algérie,” *Rev. Epidemiol. Sante Publique*, vol. 64, pp. S228–S229, 2016.

- **D. Dodda, R. Chhajed, and J. Mishra**, “Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: Possible morphological and biochemical alterations,” *Pharmacol. Reports*, vol. 66, no. 1, pp. 169–173, 2014.

- **D. S. Shouval and P. A. Rufo**, “The role of environmental factors in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases: A review,” *JAMA Pediatr.*, vol. 171, no. 10, pp. 999–1005, 2017.

- **D. Droz, N. Diebold, D. Jan, and F. Jaubert**, “Deduction from Wilms’ tumour that glomerular podocytes produce the basement membrane material bearing goodpasture determinants,” *J. Pathol.*, vol. 162, no. 4, pp. 323–327, 1990.

- **E.N. Marrieb**, “Anatomie et physiologie humaines,” 4eme edition, *DeBoeck Université*, pp. 1194, 1999.

- **E. A. Pariente**, “Physiopathologie des maladies inflammatoires de l’intestin,” *Rev. du Prat.*, vol. 41, no. 5, pp. 397–401, 1991.

- **E. V. Loftus**, “Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences,” *Gastroenterology*, vol. 126, no. 6, pp.1504–1517, 2004.

- **Erdös, E. G., Skidgel, R. A. (1987)**. The angiotensin I-converting enzyme. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 56(4), 345.

- **Fang, Y.-Z.; Yang, S.; Wu, G.**, Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **2002**, 18(10), 872-879.

- **Freitas, A. C.; Rodrigues, D.; Rocha-Santos, T. A. P.; Gomes, A. M. P.; Duarte, A. C.**, Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnology Advances* **2012**, 30 (6), 1506-1515.

- **Fan, H. B.; Liao, W.; Wu, J. P.**, Molecular interactions, bioavailability, and cellular mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Food Biochemistry* **2019**, *43* (1).

- **Girgih, A. T.; He, R.; Hasan, F. M.; Udenigwe, C. C.; Gill, T. A.; Aluko, R. E.**, Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chemistry* **2015**, *173*, 652-659.

- **G. Roda et al.**, “Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 34, pp. 4264–4271, 2010.

- **Halim, N. R. A.; Yusof, H. M.; Sarbon, N. M.**, Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, *51*, 24-33.

- **Harnedy, P. A.; FitzGerald, R. J.**, Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods* **2012**, *4* (1), 6-24.

- **Harnedy, P. A.; Parthasarathy, V.; McLaughlin, C. M.; O’Keeffe, M. B.; Allsopp, P. J.; McSorley, E. M.; O’Harte, F. P. M.; FitzGerald, R. J.**, Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle protein hydrolysate with in vitro and in vivo antidiabetic properties. *Journal of Functional Foods* **2018**, *40*, 137-145.

- **Hirose, S.; Asano, K.; Nakane, A.**, Attenuation of obesity-induced inflammation in mice orally administered with salmon cartilage proteoglycan, a prophylactic agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2017**, *484* (3), 480-485.

- **He, H. L.; Liu, D.; Ma, C. B.**, Review on the Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor Peptides from Marine Proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2013**, *169*(3), 738-749.

- **J. K. Hou, B. Abraham, and H. El-Serag**, “Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 106, no. 4, pp. 563–573, 2011.

- **J. Kabeerdoss, S. Pugazhendhi, V. Subramanian, H. J. Binder, and B. S. Ramakrishna**, “Exposure to hookworms in patients with Crohn’s disease: A case-control study,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 34, no. 8, pp. 923–930, 2011.

- **Jurjus .A. R., N. N. Khoury, and J. Reimund**, “Animal models of inflammatory bowel disease,” vol. 50, pp. 81–92, 2004.

- **J. Cosnes, C. Gowerrousseau, P. Seksik, and A. Cortot**, “Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases,” *Gastroenterology*, vol. 140, no. 6, pp. 1785-1794.e4, 2011.

- **Jun, S. Y.; Park, P. J.; Jung, W. K.; Kim, S. K.**, Purification and characterization of anantioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology* **2004**, 219 (1), 20-26.

- **J. Witowski et al.**, “IL-17 Stimulates Intraperitoneal Neutrophil Infiltration Through the Release of GRO α Chemokine from Mesothelial Cells,” 2015.

- **J. Gálvez**, “Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD,” vol. 2014, 2014.

- **Jemil, I.; Abdelhedi, O.; Nasri, R.; Mora, L.; Marrekchi, R.; Jamoussi, K.; ElFeki, A.; Hajji, M.; Toldra, F.; Nasri, M.**, Hypolipidemic, antiobesity and cardioprotective effects of sardinelle meat flour and its hydrolysates in high-fat and fructose diet fed Wistar rats. *Life Sciences* **2017**, 176, 54-66.

- **Jemil, I.; Nasri, R.; Abdelhedi, O.; Aristoy, M. C.; Ben Slama-Ben Salem, R.; Kallel, C.; Marrekchi, R.; Jamoussi, K.; ElFeki, A.; Hajji, M.; Toldra, F.; Nasri, M.**, Beneficial effects of fermented sardinelle protein hydrolysates on hypercaloric diet induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in wistar rats. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* **2017**, 54 (2), 313-325.

- **Ktari, N.; Nasri, R.; Mnafgui, K.; Hamden, K.; Belguith, O.; Boudaouara, T.; El Feki, A.; Nasri, M.**, Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced diabetic rats. *Process Biochemistry* **2014**, *49* (5), 890-897.

- **Ktari, N.; Mnafgui, K.; Nasri, R.; Hamden, K.; Bkhairia, I.; Ben Hadj, A.; Boudaouara, T.; Elfeki, A.; Nasri, M.**, Hypoglycemic and hypolipidemic effects of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced diabetic rats. *Food & Function* **2013**, *4* (11), 1691-1699.

- **K. L. Hammond**, “Inflammatory Bowel Disease,” *Surg. Clin. North Am.*, vol. 95, no.6, pp. xiii–xiv, 2015.

- **Liaset, B.; Madsen, L.; Hao, Q.; Criaes, G.; Mellgren, G.; Marschall, H. U.; Hallenborg, P.; Espe, M.; Froyland, L.; Kristiansen, K.**, Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2009**, *1791* (4), 254-262.

- **Li, G. H.; Le, G. W.; Shi, Y. H.; Shrestha, S.**, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* **2004**, *24* (7), 469-486.

- **Lee, S. H.; Qian, Z. J.; Kim, S. K.**, A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* **2010**, *118* (1), 96-102.

- **L. A. Denson**, “Epithelial Reactive Oxygen Species and Risk for Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease,” *Cmgh*, vol. 1, no. 5, pp. 456–457, 2015.

- **Lee, J. K.; Jeon, J. K.; Byun, H. G.**, Antihypertensive effect of novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods* **2014**, *7*, 381-389.

- **L. Rch, E. Europe, L. Rch, and L. Rch**, “La recto-colite hémorragique,” 2010.

- **Lee, S. H., Qian, Z. J. et Kim, S. K. (2010).** A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1), 96-102.

- **M. Van der Sluis et al.,** “Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection,” *Gastroenterology*, vol. 131, no. 1, pp. 117–129, 2006.

- **M. Montbarbon,** “Régulation de la réponse inflammatoire intestinale par la fumée de cigarette : caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires chez la souris,” 2013.

- **Nasri, R.; Abdelhedi, O.; Jemil, I.; Daoued, I.; Hamden, K.; Kallel, C.; Elfeki, A.; Lamri-Senhadji, M.; Boualga, A.; Nasri, M.; Karra-Chaabouni, M.,** Ameliorating effects of goby fish protein hydrolysates on high-fat-high-fructose diet-induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in rats. *Chemico-Biological Interactions* **2015**, 242, 71-80.

- **N. A. Molodecky et al.,** “Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review,” *Gastroenterology*, vol. 142, no. 1, pp. 46-54.e42, 2012.

- **N. Kamada, S. U. Seo, G. Y. Chen, and G. Núñez,** “Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 5, pp. 321–335, 2013.

- **Neves, A. C.; Harnedy, P. A.; O’Keeffe, M. B.; Alashi, M. A.; Aluko, R. E.; FitzGerald, R. J.,** Peptide identification in a salmon gelatin hydrolysate with antihypertensive, dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidant activities. *Food Research International* **2017**, 100, 112-120.

- **Ozata, M.; Mergen, M.; Oktenli, C.; Aydin, A.; Sanisoglu, S. Y.; Bolu, E.; Yilmaz, M. I.; Sayal, A.; Isimer, A.; Ozdemir, I. C.,** Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clinical Biochemistry* **2002**, 35 (8), 627-631.

- **O. Wéra, P. Lancellotti, and C. Oury**, “The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases,” *J. Clin. Med.*, vol. 5, no. 12, p. 118, 2016.

- **Pilon, G.; Ruzzin, J.; Rioux, L.-E.; Lavigne, C.; White, P. J.; Froyland, L.; Jacques, H.; Bryl, P.; Beaulieu, L.; Marette, A.**, Differential effects of various fish proteins in altering body weight, adiposity, inflammatory status, and insulin sensitivity in high-fat-fed rats. *Metabolism-Clinical and Experimental* **2011**, 60 (8), 1122-1130.

- **P. Desreumaux and S. Ghosh**, “Review article: Mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid - New evidence,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 24, no. SUPPL. 1, pp. 2–9, 2006.

- **P. K. Randhawa, K. Singh, N. Singh, and A. S. Jaggi**, “A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents,” vol. 18, pp. 279–289, 2014.

- **Pina, A. S.; Roque, A. C. A.**, Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *Journal of Molecular Recognition* **2009**, 22 (2), 162-168.

- **Qian, Z. J., Je, J. Y., Kim, S. K. (2007)**. Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8398-8403.

- **R. Jurjus, N. N. Khoury, and J. Reimund**, “Animal models of inflammatory bowel disease,” vol. 50, pp. 81–92, 2004.

- **Ryu, B.; Qian, Z. J.; Kim, S. K.**, Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF-kappa B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, 184 (3), 413-422.

- **R. Algerienne, D. Et, E. T. D. E. La, R. Scientifique, F. D. E. Medecine, and D. D. E. Pharmacie,** “INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L ’ INTESTIN (MICI) PAR LES ANTI tnfa,” 2019.

- **R. J. Farrell and J. T. LaMont,** “Microbial factors in inflammatory bowel disease,” *Gastroenterol. Clin. North Am.*, vol. 31, no. 1, pp. 41–62, 2002.

- **R. Ungaro, S. Mehandru, P. B. Allen, L. Peyrin-Biroulet, and J. F. Colombel,** “Ulcerative colitis,” *Lancet*, vol. 389, no. 10080, pp. 1756–1770, 2017.

- **R. R. Ghatule, G. Shalini, M. K. Gautam, A. Singh, V. K. Joshi, and R. K. Goel,** “Effect of Azadirachta indica leaves extract on acetic acid-induced colitis in rats: Role of antioxidants, free radicals and myeloperoxidase,” *Asian Pacific J. Trop. Dis.*, vol.2, no. SUPPL2, pp. S651–S657, 2012.

- **R. Fahmy,** “In vitro antioxidant, analgesic and cytotoxic activities of Sepia officinalis ink and Coelatura aegyptiaca extracts,” *African J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 7, no. 22, pp. 1512–1522, 2013.

- **Saadi, S.; Saari, N.; Anwar, F.; Hamid, A. A.; Ghazali, H. M.,** Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances* **2015**, 33 (1), 80-116.

- **Sila, A.; Bougatef, A.,** Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods* **2016**, 21, 10-26.

- **Saigusa, M.; Nishizawa, M.; Shimizu, Y.; Saeki, H.,** In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of digested peptides derived from salmon myofibrillar protein conjugated with a small quantity of alginate oligosaccharide. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2015**, 79 (9), 1518-1527.

- **Subhan, F.; Kang, H. Y.; Lim, Y.; Ikram, M.; Baek, S. Y.; Jin, S.; Jeong, Y. H.; Kwak, J. Y.; Yoon, S.,** Fish Scale Collagen Peptides Protect against CoCl₂/TNF-alpha-Induced Cytotoxicity and Inflammation via Inhibition of ROS, MAPK, and NF-kappa B Pathways in

HaCaT Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**.

- **S. B. Hanauer**, “Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities,” vol. 12, no. January, pp. 3–9, 2006.

- **S. B. Hanauer**, “Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities,” vol. 12, no. January, pp. 3–9, 2006.

- **T. A. Malik**, “Inflammatory Bowel Disease. Historical Perspective, Epidemiology, and Risk Factors,” *Surg. Clin. North Am.*, vol. 95, no. 6, pp. 1105–1122, 2015.

- **T. Curtis**, “Crystal ball - 2007 Theory and the microbial world,” *Environ. Microbiol.*, vol. 9, no. 1, p. 1, 2007.

- **T. B. Bennike, T. G. Carlsen, and T. Ellingsen**, “Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies,” vol. 21, no. 9, 2015.

- **T. Zuo, L. Cao, C. Xue, and Q. J. Tang**, “Dietary squid ink polysaccharide induces goblet cells to protect small intestine from chemotherapy induced injury,” *Food Funct.*, vol. 6, no. 3, pp. 981–986, 2015.

- **T. Jess, C. Rungoe, and L. Peyrin-Biroulet**, “Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 6, pp. 639–645, 2012.

- **U. Colitis**, “Histopathology of Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis,” *Histopathology*, vol. 18, no. 7, pp. 726–733, 2003, doi: 10.1038/ncpgasthep0528.

- **Vik, R.; Tillander, V.; Skorve, J.; Vihervaara, T.; Ekroos, K.; Alexson, S. E. H.; Berge, R. K.; Bjorndal, B.**, Three differently generated salmon protein hydrolysates reveal opposite effects on hepatic lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. *Food Chemistry* **2015**, *183*,101-110.

- **V. Andersen et al.**, “Polymorphisms in NF- κ B, PXR, LXR, PPAR γ and risk of inflammatory bowel disease,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 17, no. 2, pp. 197–206, 2011.

- **V. Vinod Prabhu and C. Guruvayoorappan**, “Protective effect of marine mangrove *Rhizophora apiculata* on acetic acid induced experimental colitis by regulating anti-oxidant enzymes, inflammatory mediators and nuclear factor-kappa B subunits,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 18, no. 1, pp. 124–134, 2014.

- **W. A. Faubion, E. V. Loftus, W. S. Harmsen, A. R. Zinsmeister, and W. J. Sandborn**, “The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: A population-based study,” *Gastroenterology*, vol. 121, no. 2, pp. 255–260, 2001.

- **Wang, T. Y.; Hsieh, C. H.; Hung, C. C.; Jao, C. L.; Chen, M. C.; Hsu, K. C.**, Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: A comparison between warm- and cold-water fish. *Journal of Functional Foods* **2015**, *19*, 330-340.

- **X. Niu, T. Fan, W. Li, H. Huang, Y. Zhang, and W. Xing**, “Protective effect of sanguinarine against acetic acid-induced ulcerative colitis in mice,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 267, no. 3, pp. 256–265, 2013.

- **Y. Z. Zhang and Y. Y. Li**, “Inflammatory bowel disease: Pathogenesis,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 1, pp. 91–99, 2014.

- **Z.J. David, J. Lefevre, A. Chrysostalis**, “Hépatologie gastro-entérologie chirurgie,viscérale”. 7eme édition, IKB, pp 620, 2020.

- **Zhao, Y., Li, B., Dong, S., Liu, Z., Zhao, X., Wang, J., Zeng, M. (2009)**. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides*, 30(6), 1028-1033.