

Université des Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre :
N° de série :



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement
Option : **Physio-Toxicologie Cellulaire**

Présentée et soutenu par :

Bouameur Somia

Intitulé :

**Le potentiel biologique préventif des polysaccharides
issus de *Gelidium spinosum* récoltée des cotes de la
région de Jijel**

Membres du jury :

Président :	Pr. AMEDDAH Souad	Université des Frères Mentouri Constantine1
Directeur de thèse:	Pr. MENAD Ahmed	Université des Frères Mentouri Constantine1
Examineurs :	Pr. LALAOUI Korichi	Université des Frères Mentouri Constantine1
	Pr. BENCHEIKH Fatima	Université de Ferhat Abbas University Setif 1
	Dr. HANFAR Mourad	Université de Mustapha Ben Boulaid Batna 2

**Année universitaire
2021/2022**

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier cette thèse en signe de respect et de reconnaissance :

A ma très chère mère :

A cette femme exceptionnelle, qui m'inspire depuis toujours et à qui je dois tout ; qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, son encouragement et tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils ;

A ma maman qui m'a tout donnée, je t'aimerais toujours ; vos prières m'ont accompagné tout au long de ma vie.

J'aurais tellement aimé que tu sois auprès de nous aujourd'hui. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde et l'accueillir en son vaste paradis.

A mon très cher père :

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es.

Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

A mes chers adorables frères et sœur :

Qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail ; ils ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours ; puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout de réussite.

A mon cher grand père paternel pour leur soutien .Merci pour l'amour et la chaleur que tu me procures.

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et la vivacité.

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, à qui je souhaite plus de succès.

Bouameur Somia.

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, la volonté, le courage et la patience pour réaliser ce travail de recherche.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, monsieur Professeur Menad Ahmed , pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Je remercie également Mme le Professeur Ameddah Souad pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses conseils, son aide précieuse et pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Mes chers professeurs, vous avez fait de moi un chercheur accompli. Je vous suis reconnaissant, J'avais bénéficié, au cours de mes études, de votre enseignement clair et précis. Votre gentillesse, vos qualités humaines, votre modestie n'ont rien d'égal que votre compétence. Je ne saurais jamais vous remercier assez.

Je tiens à remercier également les membres du Jury Mr le professeur Lalaoui K. , Mme le professeur Bencheikh F et Mr le Dr Hanfer M, qui m'ont honoré d'avoir accepté d'examiner et de juger ma thèse.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Bodil Jørgensen pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire au département de plante et science enveronemtal, section de glycobiologie à l'université Copenhagen, Denmark. Je la remercie pour son intérêt à mon travail, pour ses conseils et l'encadrement de haut niveau qu'elle m'a offert. Qu'elle trouve ici mes sincères gratitudes et remerciements. Sans oublier tous les membres de son équipe, spécialement professeur Andreas, Dr jaya, Dr Alex, Dr clair, merci pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble, pour votre disponibilité et pour avoir contribué à la réussite de mon stage.

Je tiens à adresser mes remerciements au Dr Bensouici Chawki pour m'avoir accueilli dans son équipe au centre de recherche de biotechnologie à Constantine et pour ses conseils tout au long de mon stage. Je remercie aussi tous les membres de cette équipe.

Mes remerciements pour tous les membres des équipes scientifiques du laboratoire de Biologie et environnement.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

RESUMES

Résumé

L'étude des polysaccharides issus de la flore algale couvrant le littoral de l'Est algérien demeure minime. Pour cette raison, la présente investigation s'engage à explorer le potentiel antioxydant et anti-inflammatoires des polysaccharides issues d'une espèce appartenant aux algues rouges (les rhodophycées) *Gelidium spinosum* collectée de la zone de Beni Belaid (willaya de Jijel). L'extrait polysaccharidique de *Gelidium spinosum* (EPGS) a prouvé un effet antioxydant important, élucidé par plusieurs tests *in vitro* (L'effet scavenger du DPPH°, l'effet scavenger de l'ABTS°+ et le pouvoir réducteur). L'étude *in vivo* a été réalisée en utilisant des souris prétraitées par le EPGS / mésalazine par une dose orale de 60 /75 mg Kg durant 7 jours; puis traitées par le DSS (2,5 %) pendant 7 jours. Les résultats obtenus ont révélé que le EPGS diminue les symptômes de la colite ulcéreuse induite par le DSS (indice d'activité de la maladie; DAI). Les effets protecteurs significatifs du EPGS ont été associés par une réduction de l' MDA et un rétablissement de l'activité de LDH, une amélioration remarquable des activités de la SOD et de la CAT et une restauration d'enzymes métabolisant le glutathion (GPx, GST) au niveau du tissu du côlon. Concernant l'aspect anti-inflammatoire, l'EPGS a prouvé une capacité de piégeage du NO et des peroxy-nitrites. Le prétraitement avec l'EPGS a normalisé les marqueurs du stress nitrosatif, (NO, S-nitrosothiol et le peroxy-nitrite) et a atténué significativement les taux des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) et l'activité de la MPO. La cohérence des propriétés biologiques et les mécanismes d'action de cette extrait sont liés probablement à la richesse diversifiée de l'extrait algal de cette espèce en terme de polysaccharides bioactives confirmé via l'analyse chimique de EPGS par HPAEC-PAD qui a montré que son profil monosaccharidique est caractérisé une prédominance du galactose et de l'acide galacturonique, et de l'acide glucuronique qui peuvent moduler en synergie l'effet des différentes complications induites par le DSS.

Mots clé: *Gelidium spinosum*, anti-inflammatoire, Dextran Sulfate sodium, stress nitrosatif, stress oxydatif.

Abstract

The study of polysaccharides from algal flora covering the eastern Algerian coast remains minimal. For this reason, the present investigation is committed to exploring the antioxidant and anti-inflammatory potential of polysaccharides from a species belonging to red algae (rhodophyceae) *Gelidium spinosum* collected from the area of Beni Belaid (willaya de Jijel). The polysaccharide extract of *Gelidium spinosum* (PEGS) has proven an important antioxidant effect, elucidated by several *in vitro* tests (The scavenger effect of DPPH°, the scavenger effect ABTS°+, the reducing power). The *in vivo* study was carried out using mice pretreated with PEGS / mesalazine with an oral dose of 60/75 mg kg for 7 days; then treated with DSS (2.5%) for 7 days). The results obtained revealed that PEGS decreases the symptoms of ulcerative colitis induced by DSS (Disease Activity Index; DAI). The significant protective effects of PEGS have been associated with a reduction in MDA and restoring LDH activity, a remarkable improvement in SOD and CAT activities, and a restoration of glutathione metabolizing enzymes (GPx, GST) in colon tissue. Regarding the anti-inflammatory aspect, PEGS has proven an ability to trap NO and peroxynitrites. Pretreatment with PEGS normalized markers of nitrosative stress (NO, S-nitrosothiol and peroxynitrite) and significantly attenuated pro-inflammatory cytokine levels (TNF- α and IL-6) and activity of MPO. The consistency of the biological properties and the mechanisms of action of this extract are probably linked to the diverse richness of the algal extract of this species in terms of bioactive polysaccharides confirmed by the chemical analysis of PEGS by HPAEC-PAD which showed that its monosaccharide profile is characterized by a predominance of galactose and galactoronic acid, and glucuronic acid, which can synergistically modulate the effect of the various complications induced by DSS.

Mots clé: *Gelidium spinosum*, anti-inflammatory, Dextran Sulfate sodium, nitrosative stress, oxidative stress.

الملخص

لا تزال دراسة عديدة السكريات الموجودة في المستوطنة الطحلبية المنتشرة بالساحل الشرقي للجزائر محدودة، ولذا فإن هذه الدراسة تهدف إلى استكشاف مضادات الأكسدة والالتهابات الممكنة لعدة السكريات من أحد أنواع الطحالب الحمراء منها *Gelidium spinosum* الذي تم جلبه من منطقة بني بلعيد (ولاية جيجل). أثبت الـ EPGS تأثيراً مهماً مضاداً للأكسدة، تم توضيحه من خلال العديد من الاختبارات المعملية (تأثير اللاقط لـ $DPPH^{\circ}$ ، وتأثير اللاقط لـ $ABTS^{\circ+}$ ، والكفاءة الاختزالية للـ EPGS و β -glucan. أجريت الدراسة في الجسم الحي (*in vivo*) باستخدام فئران تمت معاملتها مسبقاً EPGS /ميسالازين بجرعة فموية 75/60 مغ/كغ لمدة 7 أيام؛ ثم عوملت بالـ DSS (2.5٪) (لمدة 7 أيام). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الـ EPGS يقلل من أعراض التهاب القولون التقرحي (المحرّض بالـ DSS مؤشر النشاط المرضي هو DAI). ارتبطت التأثيرات الوقائية الهامة للـ EPGS مع انخفاض في MDA واستعادة نشاط LDH، وتحسن ملحوظ في نشاط SOD و CAT، واستعادة نشاط إنزيمات استقلاب الجلوتاثيون (GPx، GST) في بالنسيج القلوني. أما فيما يتعلق بالجانب المضاد للالتهابات فقد أثبتت الـ EPGS قدرته على التقاط كل من NO و peroxynitrites أدت المعاملة المسبقة بالـ EPGS إلى تعديل مؤشرات الاجهاد النيتروجيني (NO، S-nitrosothiol، peroxynitrite) وإلى انخفاض معنوي ملحوظ لمستويات السيتوكينات المسببة للالتهابات ($TNF-\alpha$) و IL-6 وكذا نشاط MPO. قد يكون تضافر الخصائص البيولوجية وآليات عمل هذا المستخلص مرتبطاً بالثراء المتنوع لمستخلص هذا النوع الطحالي من حيث السكريات النشطة بيولوجياً والتي أكدها التحليل الكيميائي لـ EPGS بواسطة HPAEC-PAD الذي أظهر أن ملمحه السكريات الأحادية يتميز بغلبة حمض الجالاكتوز والجالاكتورونيك وحمض الجلوكورونيك التي يمكن أن تعدل بشكل تآزري تأثير المضاعفات المتعددة الناجمة عن الـ DSS.

الكلمات الاستدلالية *Gelidium spinosum*، مضادات الالتهابات، Dextran Sulfate sodium، الاجهاد النيتروجيني، الاجهاد التأكسدي.

Sommaire	Page
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
I. INTRODUCTION	1
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Colon et maladies inflammatoires chroniques	3
1.1. Anatomie macroscopique et microscopique du Colon	3
1.2 Rôle Physiologique	4
1.3. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	4
1.3.1. La rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH)	6
1.3.2. Etiologie et épidémiologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	8
1.3.3. Epidémiologie de la rectocolite ulcéro-hémorragique	9
1.3.4. Etiologie et pathogénie	10
1.4. Physiopathologie de la colite ulcéreuse	12
1.4.1. RCUH et la réponse Inflammatoire	12
1.4.2. RCUH et stress oxydant	15
1.5. Modèles expérimentaux de la colite ulcéreuse	17
1.6. Approches Thérapeutiques et effets Secondaires	20
2. Les algues	24
2.1. Généralités sur les algues	24
2.2. Classification des algues	24
2.3. Les algues rouges (Rhodophycées)	24
2.3.1. Domaine d'application des algues rouges	25
2.4. <i>Gelidium sp.</i>	25
3. Les polysaccharides	27
3.1. Généralités sur les polysaccharides	27
3.2. Les types de polysaccharides chez les rhodophycées	27
3.2.1. Les polysaccharides de réserve (stockés à l'intérieur de la cellule)	27
3.2.2. Les polysaccharides de faible poids moléculaire	27
3.2.3. Les polysaccharides de structure	27
3.3. Les polysaccharides sulfatés chez les rhodophycées	29
3.3.1. L'agar agar	29
3.3.2. La carraghénane	30
4. Les effets des polysaccharides issus des algues marines sur la RCUH	32
4.1. Polysaccharides algaux et RCUH	32
4.1.1. Les polysaccharides et les voies pro-inflammatoires	32
4.1.1.1. Les cytokines pro-inflammatoires	32
4.1.1.2. Les molécules d'adhésion intercellulaire et lymphocytes-endothéliaux	33

4.1.1.3. Cellules épithéliales intestinales (CEI)	34
4.1.1.4. Espèces actives d'oxygène et NO	34
4.1.1.5. Le microbiote	35
III. MATERIELS ET METHODES	36
1. Etude phytochimique	36
1.1. Identification de l'algue <i>Gelidium spinosum</i>	36
1.2. Site d'échantillonnage	37
1.3. Collecte et traitement des échantillons	37
1.4. Authentification d'espèce sélectionnée	37
1.5. Extraction des polysaccharides (extrait brut)	38
1.6. Caractérisation des polysaccharides	40
1.6.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) des oses constitutifs d'EPGS	40
1.6.2. Caractérisation quantitative par HPAEC-PAD	41
2. Etude biologique	41
2.1. Évaluation de l'activité antioxydante de <i>Gelidium spinosum</i>	41
2.1.1. Evaluation de l'activité antioxydant <i>in vitro</i>	41
2.1.1.1. Activité anti radicalaire : test de piégeage du radical libre DPPH	42
2.1.1.2. Activité anti radicalaire ABTS:(teste de décoloration du radical cationique ABTS ^{o+})	42
2.1.1.3. Dosage du pouvoir réducteur	43
2.1.2. Évaluation de l'activité antioxydant <i>in vivo</i>	43
2.1.2.1. Animaux d'expérimentation	43
2.1.2.2. Évaluation de la toxicité aiguë de l'EPGS	44
2.1.2.3. Induction du RCUH chez la souris	44
2.1.2.4. Evaluation des marqueurs du stress oxydant	46
2.1.2.4.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	46
2.1.2.4.2. Dosage du superoxyde dismutase (SOD) cytosolique	47
2.1.2.4.3. Dosage de la catalase (CAT) cytosolique L'activité	47
2.1.2.4.4. Dosage du glutathion réduit (GSH)	47
2.1.2.4.5. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)	48
2.1.2.4.6. Dosage du glutathion peroxydase (GPx) cytosolique	48
2.1.2.4.7. Dosage de lactate déshydrogénase (LDH)	49
2.1.3. Evaluation des Marqueurs de stress nitrosatif	49
2.1.3.1. Evaluation des Marqueurs de stress nitrosatif <i>in vitro</i>	49
2.1.3.1.1. Activité de piégeage du monoxyde d'azote (NO)	49
2.1.3.1.2. Évaluation de l'activité de piégeage du peroxyde d'azote (ONOO ⁻)	49
2.1.3.2. Evaluation des Marqueurs de stress nitrosatif <i>in vivo</i>	50
2.1.3.2.1. Mesure de l'oxyde nitrique, S-nitrosothiol et du peroxyde d'azote	50
2.1.4. Évaluation des marqueurs d'inflammation	50
2.1.4.1. Mesure de l'activité de myéloperoxydase (MPO)	50

2.1.4.2. Évaluation des cytokines dans le côlon	51
2.1.5. Analyse macroscopique et microscopique de l'inflammation du côlon	51
2.1.5.1. Examen macroscopique	51
2.1.5.2. Analyse microscopique et examen histologique	51
3. Analyses statistiques	52
IV. RESULTATS	53
1. Rendement des extraits bruts de polysaccharides	54
2. Evaluation de l'activité antioxydant d'extrait algal	54
2.1. L'activité antioxydante d'extrait algal <i>in-vitro</i>	54
2.1.1. L'effet scavenger du DPPH°	54
2.1.2. L'effet scavenger de l'ABTS°+	55
2.1.3. Le pouvoir réducteur	56
2.2. Évaluation de l'activité antioxydant <i>in vivo</i>	56
2.2.1. Évaluation de la toxicité aigüe de l'EPGS	56
2.2.2. Effet de EPGS sur l'indice d'activité de la maladie (DAI) et la longueur du côlon	57
2.2.3. Effet de EPGS sur les marqueurs du stress oxydatif dans la muqueuse colique des souris	58
2.2.3.1. Effet sur le taux de malondialdéhyde (MDA) et lactate déshydrogénase(LDH)	58
2.2.3.2. Effet sur l'activité enzymatique de CAT et SOD cytosolique	59
2.2.3.3. Effet sur le glutathion et les enzymes métabolisant le glutathion	59
2.3. Effet de EPGS sur les marqueurs du stress nitrosatif	60
2.3.1. Effet de EPGS sur les marqueurs du stress nitrosatif <i>in vitro</i>	60
2.3.1.1. Activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO)	60
2.3.1.2. Activité de piégeage des peroxynitrites d'EPGS	61
2.3.2. Effet de EPGS sur les marqueurs de stress nitrosatif <i>in vivo</i> dans la muqueuse colique	61
2.4. Effet de EPGS sur les marqueurs d'inflammation dans la muqueuse colique des souris	62
2.4.1. Activité MPO dans les tissus du côlon	62
2.4.2. Effet de EPGS sur les taux des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6	63
2.5. Analyse macroscopique et microscopique	64
2.5.1. L'Examen macroscopique	64
2.5.2. L'examen microscopique / histopathologique	65
V. DISCUSSION	67
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	72
VII. RÉFÉRENCES	74

Liste des abréviations

ABTS	3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AP	Activating protein
BHT	Butylhydroxytoluène
CC	Colite collagène
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD	Cellule dendritique
CDNB	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
CEI	Cellules épithéliales intestinales
CI	Colite indéterminée
CK	Cytokine
CL	Colite lymphocytaire
COX-	Cyclo-oxygénase
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CU	Colite Ulcéreuse
CXCR	C-X-C chemokine receptor
DAI	Disease Activity Index
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSS	Dextran sodium sulfate
DTNB	Acide 5,5 dithiodis-2-nitrobenzoïque
EPGS	Extrait polysaccharidique de <i>Gelidium spinosum</i>
ERA	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAO	Food and Agriculture Organization
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion S-transférase
HE	Hématoxyline-éosine
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN	Interféron
IL	Interleukine
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IκB	Inhibitor of NF-κB
JAK1	Janus Kinase 1

LDH	Lactate déshydrogénase
LMW-PS	Low molecular weight polysaccharide
LMW-sPS	low molecular weight Sulfated polysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies inflammatoires chronique de l'intestin
MII	Maladies inflammatoire de l'intestin
MPO	Myéloperoxydase
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
NOS	Nitric oxide synthase
PEGS	Polysaccharide extract of <i>Gelidium spinosum</i>
PG-PS	Peptidoglycan-polysaccharide
PLS	Polysaccharides sulfaté
PMN	Polymorphonucléaires
PON	Peroxynitrite
PS	Polysaccharide
RCUH	Rectocolite ulcéro-hémorragique
RSNO	S-nitrosothiol
S1P	Sphingosine-1-phosphate
TBA	Tribromoanisole
TCA	Trichloroanisole
TGF-β	Facteur de croissance transformant bêta
TH	Cellules T helper
TL	Récepteurs Toll-like
TLR9	Toll-like receptor 9
TNBS	Trinitrobenzene sulfonic acid
TNF-	Tumor necrosis factor
Treg	Cellules T régulatrices
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

Liste des figures

N°	Titres	Page
Figure 1 a	Anatomie du colon.	3
Figure 1 b	Histologie du colon.	3
Figure 2	L'atteints de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse. Comparaison de la muqueuse colique.	6
Figure 3	La lésion histologique (microscopique) typique de la rectocolite.	7
Figure 4	Les différentes formes de la RCUH.	8
Figure 5	Physiopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin.	11
Figure 6	Mécanisme de physiopathologie de la RCUH.	12
Figure 7	Régulation de la migration des neutrophiles lors d'une inflammation aiguë.	15
Figure 8	Modèle de stress oxydatif dans la RCUH.	16
Figure 9	Interface entre l'interaction des espèces réactives intestinales et l'état d'oxydo-réduction systémique dans la muqueuse intestinale saine et inflammée	17
Figure 10	Organigramme des soins des patients atteints de la RCUH.	21
Figure 11	Approches thérapeutiques des MICI.	22
Figure 12	structure moléculaire de l'agar-agar.	30
Figure 13	structure chimique de la carraghénane.	31
Figure 14	Thalle de <i>Gelidium spinosum</i> récolté de la zone de Beni Belaid (2016) (willaya de Jijel).	36
Figure 15	Localisation géographique du site d'échantillonnage (Google Earth, 2021).	37
Figure 16	Protocole d'extraction des polysaccharides.	39
Figure 17	Répartition des animaux en groupes conçus pour l'expérimentation.	45
Figure 18	CCM de l'hydrolyse d'EPGS par l'acide trifluoroacétique 4 M à 110°C.	53
Figure 19	Composition en monosaccharide d'EPGS effectué par HPAEC-PAD.	53
Figure 20	Activités scavenger du radical DPPH de EPGS et des standards. Les valeurs sont présentées en moyennes $\pm$ SD (n=3) p<0,01.	54
Figure 21	Activités scavenger du radical ABTS ^{•+} d'EPGS et du standard.	55
Figure 22	Pouvoir réducteur d'EPGS et du β -glucane.	56
Figure 23	L'effet d'EPGS et du mésalazine sur l'indice d'activité de la maladie (DAI) et la longueur du côlon.	57
Figure 24	L'effet d'EPGS (60 mg/Kg) sur le taux du MDA et du LDH dans le groupe DSS.	58
Figure 25	L'effet de EPGS sur les marqueurs de stress oxydatif du muqueuse colique, les activités SOD et CAT (a). Glutathion et enzymes métabolisant le glutathion (b).	59
Figure 26	Activités scavenger du NO [•] d'EPGS et des standards.	60
Figure 27	Activité de piégeage de l'ONOO ⁻ des EPGS et du standard.	61
Figure 28	Effet de EPGS sur les marqueurs du stress nitrosatif NO, PON et RSNO dans la muqueuse colique.	61
Figure 29	Effet d'EPGS sur l'activité MPO dans les tissus coliques.	62
Figure 30	Effet d'EPGS sur les Cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse colique des souris TNF- α (a), IL-6 (b).	63
Figure 31	Effet d'EPGS sur l'évaluation macroscopique et microscopique de la muqueuse colique.	64
Figure 32	Micrographe de l'examen histopathologique des colons distaux.	65

Liste des tableaux

Numéro	Titres	Page
Tableau 1	Caractéristiques de la RCUH et la MC.	5
Tableau 2	les effets secondaires des traitements médicamenteux.	23
Tableau 3	Les espèces rhodophycées marines produisant les polysaccharides bioactifs.	28
Tableau 4	Classification de Mayo.	45
Tableau 5	Rendement d'extraits brut des polysaccharides issus de <i>Gelidium spinosum</i> (EPGS).	53

I. INTRODUCTION

1. Introduction

La rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH) est l'une des deux principales formes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) qui se caractérise par une activation inadéquate du système immunitaire systémique et intestinal qui se traduit par la suite par une dérégulation de l'immunologie de la muqueuse [1]. Des études récentes ont montré que les espèces réactives de l'oxygène (ERO), les espèces réactives l'azote (ERA) et les troubles des voies inflammatoires peuvent être impliqués dans la pathogenèse de la RCUH, et peuvent devenir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la RCUH [2]. Le modèle de colite induite par le DSS (dextran sodium sulfate) chez les souris est largement utilisé dans les études de l'étiologie de la RCUH vu les nombreux symptômes pathologiques qui sont trouvées avec ce modèle sont couramment observés chez les individus atteints par la RCUH [3]. La colite expérimentale induite par le DSS chez la souris vise à concevoir un modèle de lésion intestinale aiguë imitant plusieurs atteintes intestinales compatibles avec les MICI [4]. Les stratégies thérapeutiques actuelles pour la gestion des MII (maladies inflammatoires de l'intestin) englobent des interventions pharmacologiques incluant les médicaments anti-inflammatoires, les immunosuppresseurs, les antibiotiques et les thérapies biologiques. Les aminosalicylates et/ou les glucocorticoïdes demeurent les principaux traitements des MICI [5]. Seulement, les thérapies actuelles des MII utilisant cette approche ont prouvé un succès limité et elles sont liées à plusieurs effets secondaires indésirables [6]. Ainsi, l'utilisation des produits naturels est devenue rapidement une approche attrayante pour le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin; et de nouvelles pistes thérapeutiques prévenant contre cette maladie sont souhaitées.

Le biotope marin recouvre près de trois quarts de la surface du globe terrestre donnant ainsi un écosystème unique en matière de biodiversité. Parmi les organismes abritant ce biotope on trouve les algues qui représentent la quasi-totalité de la flore marine et qui font preuve d'une immense richesse écologique [7, 8]. En se développant dans les eaux peu profondes, les algues marines se présentent comme les thallophytes les plus productifs de l'écosystème marin et qui sont continuellement exposées aux pressions surtout d'ordre abiotiques qui influencent la physiologie de l'organisme menant par la suite à la mise en place d'un processus biologique adaptatif doté d'une remarquable efficacité et donnant à ces algues une faculté extraordinaire à élaborer des principes structuraux qui pourraient constituer d'importantes ressources.

La recherche des substances naturelles possédant des propriétés biologiques peut contribuer à la découverte des principes ayant des intérêts dans le domaine de l'application pharmacologique et toxicologique. D'après la littérature, plusieurs métabolites secondaires algales sont utilisés dans la médecine traditionnelle, parmi lesquels on trouve les polysaccharides [9]. Les polysaccharides

sont dotés d'activités biologiques anti-inflammatoire, antimicrobiennes, anticancéreuses, antivirales, anticoagulant et antioxydant [10, 11]. Du à leurs potentiels thérapeutiques, l'isolement des polysaccharides a fait l'objet des plusieurs études visant à la découverte de nouvelles substances d'intérêt pharmaceutiques [12]. Cependant malgré les nombres des composés bioactifs existant, la survenue de plusieurs nouvelles maladies physiopathologiques impose une exigence continuelle à la recherche des composés thérapeutiques originaux. Ces derniers temps, un intérêt particulier est porté à la recherche des polysaccharides antioxydants et anti-inflammatoires et à la mise en évidences des preuves montrant que les polysaccharides issues des algues marines pourraient jouer un rôle important dans la prévention contre les dommages inflammatoires et les troubles induits par le stress oxydant [13] qui est inculpé dans le vieillissement et de nombreuses d'autres maladies telles le cancer, les accidents cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives [14]. Selon des études bibliographiques, les algues représentent des ressources potentielles d'antioxydants naturels possédant la capacité d'éliminer les espèces d'oxygène réactives (ERO) et diminuer donc, les dommages oxydatifs touchant les cellules vivantes [15]. Ces recherches bibliographiques ont montré que les polysaccharides provenues des espèces appartenant aux algues rouges (les Rhodophycées) ont prouvé un effet antiinflammatoire [16] et une protection vis-à-vis la dégradation oxydative des aliments [17].

L'étude des polysaccharides issus de la flore algale couvrant le littoral de l'Est algérien demeure minime. Ainsi, une valorisation raisonnable des potentialités de cette flore marine devienne une nécessité capitale. Dans ce sens, la présente investigation s'engage à explorer, *in vivo* et *in vitro*, le potentiel antioxydant et anti-inflammatoires des polysaccharides issues d'une espèce appartenant aux algues rouges (les rhodophycées), à savoir *Gelidium spinosum* collectée de la zone de Beni Belaid (wilaya de Jijel).

La méthodologie adoptée durant ce travail a compris les étapes suivantes :

- Collection et authentification taxonomique de l'espèce algologique *Gelidium spinosum* à la zone sélectionnée.
- Extraction des polysaccharides via des protocoles préconisés donnant un rendement adéquat.
- Etude phytochimique de *Gelidium spinosum*
- Etudes de l'effet antioxydant *invitro*. Réalisation des études de l'effet antioxydant *in vivo* des polysaccharides. (rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH))
- Etude de l'effet anti-inflammatoire des polysaccharides *in vivo* et *in vitro*.

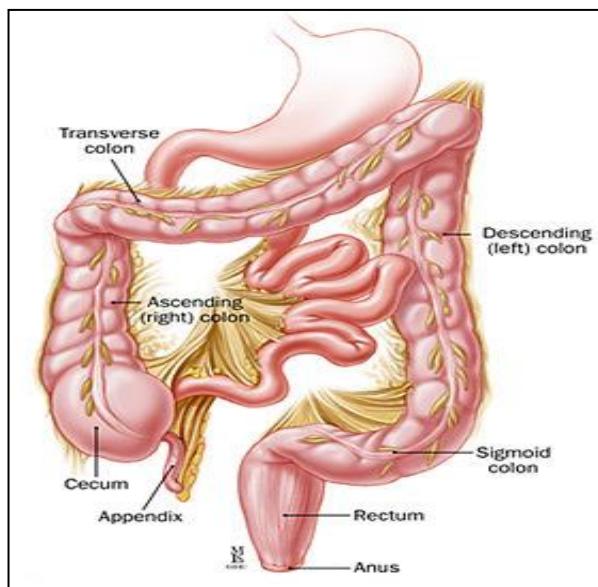
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Colon et maladies inflammatoires chroniques

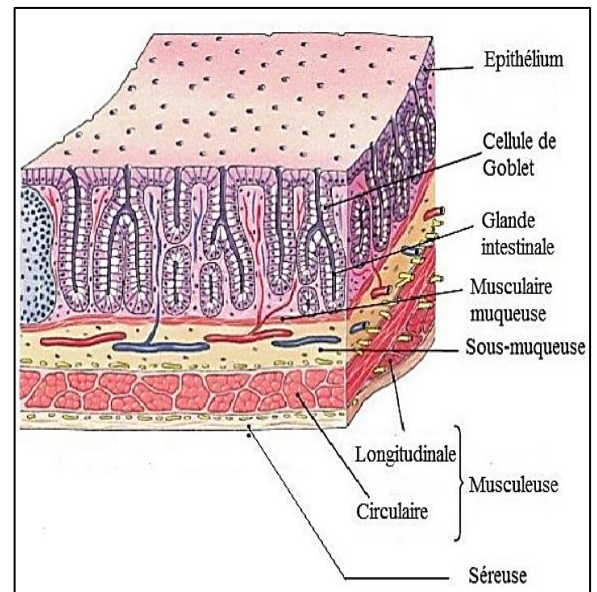
1.1. Anatomie macroscopique et microscopique du Colon

Le côlon, également nommé le gros intestin, est une partie du tube digestif comprise entre la fin de l'intestin grêle et le rectum qui mesure en moyenne 1,5 m de longueur pour 2.5 à 7 cm de diamètre. Le gros intestin est une structure assez uniforme, comprenant le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde et le rectum (Figure 1a) [18]. De point de vue histologique, La paroi colique est constituée de quatre couches allant de l'intérieur vers l'extérieur incluant : la muqueuse organisée en épithélium, membrane basale, chorion, musculaire muqueuse respectivement; la sous-muqueuse ; la musculuse et la séreuse [19] (Figure 1b).



(a)

Figure 1 a : Anatomie du colon [20]



(b)

Figure 1 b : Histologie du colon [21]

La muqueuse intestinale colique est la couche la plus interne formée par l'épithélium glandulaire, la lamina propria et la muscularis mucosae, l'épithélium glandulaire forme des structures cylindriques, appelées cryptes. A la surface des cryptes on trouve les cellules épithéliales qui absorbent l'eau et les électrolytes. En plus de ces cellules absorptives, on retrouve également des cellules dites caliciformes qui s'intercalent entre celles-ci. Elles assurent la production d'une substance visqueuse, le mucus. La sous-muqueuse quant à elle, est formée d'un tissu conjonctivo-

vasculaire dans lequel on trouve des fibroblastes, quelques macrophages et polynucléaires. La couche musculuse se divise en couche musculuse longitudinale externe qui permet la progression du chyme, et la couche circulaire interne qui permet d'augmenter la surface d'échange. Celle-ci est entourée d'une couche conjonctive externe : la séreuse [22].

1.2. Rôle Physiologique

Le gros intestin mesure environ 5 à 6 pieds de long et 2,5 pouces de diamètre. C'est le site d'absorption du sel et de l'eau. Les glandes sécrètent de grandes quantités d'alcalinmucus qui lubrifie le contenu intestinal et neutralise les acides formés par les bactéries dans l'intestin. Ces bactéries aident à la décomposition des résidus alimentaires non digérés, glucides non absorbés, acides aminés, débris cellulaires et bactéries mortes par le processus de segmentation et de putréfaction. Les acides gras à chaîne courte, formés par les bactéries des glucides complexes non absorbés, fournissent une source d'énergie pour les cellules du côlon gauche. Le maintien de l'équilibre potassique est également attribué à la colon, où l'épithélium absorbe et sécrète du potassium (K) et du bicarbonate [18].

Le côlon joue un rôle limité dans la digestion, mais il est aussi important pour la formation et le stockage des selles. La fonction principale du côlon réside dans le contrôle du volume et la composition ionique finale des selles. Il permet la résorption d'eau et des électrolytes [18]. Il absorbe environ 1,5 L d'eau par jour à partir des selles (par un transporteur de sodium en échange de potassium), il absorbe le chlorure en échange de bicarbonate ainsi que la vitamine K produite par la flore colique [23, 24].

1.3. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), sont des affections qui entraînent une inflammation et une ulcération du tube digestif, résultant d'une réponse immunitaire anormale [25]. Il assemble deux grandes affections qui comportent des caractéristiques pathologiques distinctes mais avec certains chevauchements : La rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH) et la maladie de Crohn (MC) (Figure 2), mais une troisième forme appelée colite indéterminée (CI) [26] peut être ajoutée [27]. Cette dernière présente les caractéristiques d'une colite idiopathique dont l'examen ne permet pas de différencier entre la maladie de Crohn et le recto colite.

Tableau 1 : Caractéristiques de la RCUH et la MC [28].

Caractéristique	Rectocolite ulcéreuse hémorragique	Maladie de Crohn (MC)
Distribution de la maladie	Diffuse et continue	Segmentaire
Atteinte rectale	Toujours (chez les adultes)	Occasionnellement
Sévérité de la maladie	Augmentant vers l'extrémité distale	Instable et variable
Atteinte iléale	Occasionnellement	Souvent
Localisation de la maladie dans la paroi colique	Superficielle (muqueuse)	Transmurale
Agrégats lymphoïdes transmuraux	Rare, sous les ulcères	N'importe quel endroit
Fissures	Rares, superficielles dans la colite fulminante	Profondes, n'importe quel endroit
Sinus et fistules	Absents	Présent

En outre, il existe plusieurs autres types de colites chroniques, telles que la colite collagène (CC), la colite lymphocytaire (CL), la diverticulite et la colite de diversion, qui, dans certains cas, peuvent présenter des caractéristiques de type RCUH ou MC au cours de la maladie [29].

La MC peut toucher tout le tractus gastro-intestinal de la bouche à l'anus, mais les endroits les plus communs sont la dernière partie de l'intestin grêle et le côlon, alors que la RCUH est seulement présente dans le côlon. Dans la RCUH, seule la paroi interne du côlon est enflammée, alors que la MC affecte l'épaisseur totale de la paroi intestinale. La MICI dure toute la vie et, à ce jour, il n'y a pas de remède [30, 31].

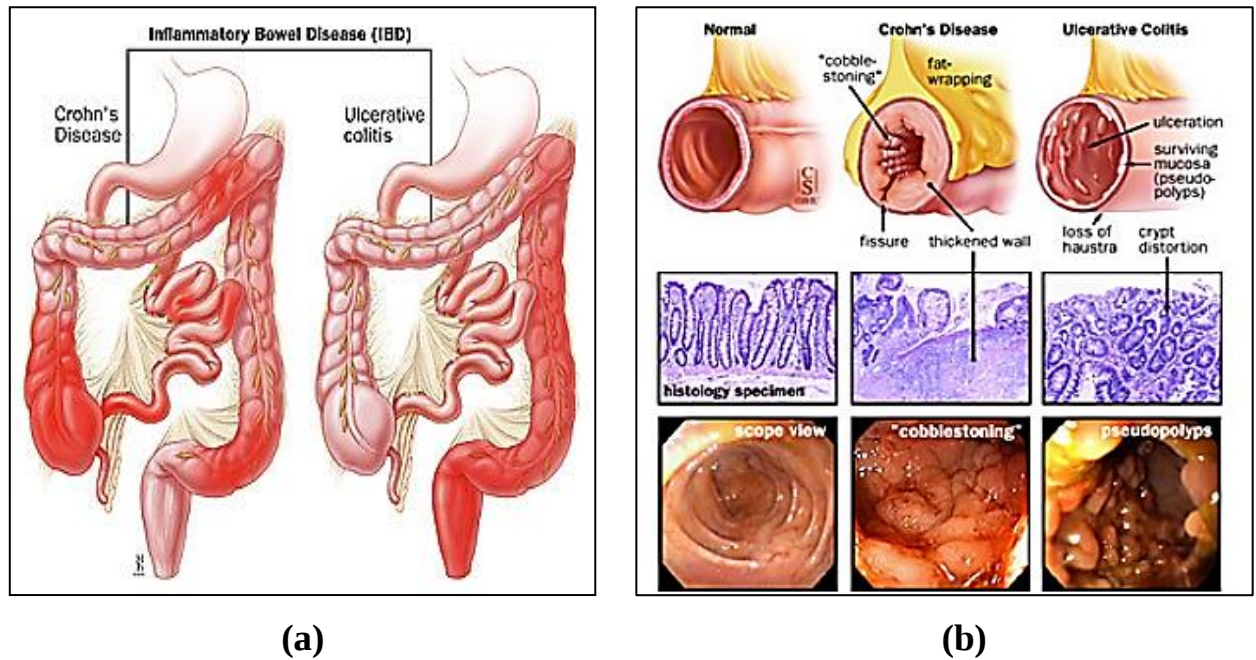


Figure 2: (a) L'atteints de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse. (b) Comparaison de la muqueuse colique chez des patients normaux, atteints de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse. Abscès de la crypte et les granulomes ne sont présents que dans la maladie de Crohn [32].

1.3.1. La rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH)

La RCUH est caractérisée par des ulcérations superficielles continues du revêtement intérieur du gros intestin, dit muqueuse, et de la sous muqueuse qui peut être source de saignement [33]. La rectocolite hémorragique est une maladie intestinale inflammatoire idiopathique qui affecte la muqueuse colique. L'étendue de la maladie est variable et peut impliquer uniquement le rectum (rectite ulcéreuse), côté gauche du côlon jusqu'à l'angle splénique ou l'ensemble côlon (pancolite). La gravité de la maladie peut également être très variable sur le plan histologique, allant d'ulcérations minimales à florides et de dysplasie. L'inflammation débute dans la couche muqueuse rectale pour s'étendre sur une portion ou sur l'ensemble du côlon sans atteindre d'autres segments du tractus digestif (Figure 3) [34]. La pathologie évolue par poussées interrompues par des périodes calmes asymptomatiques (phase de rémission) [35].

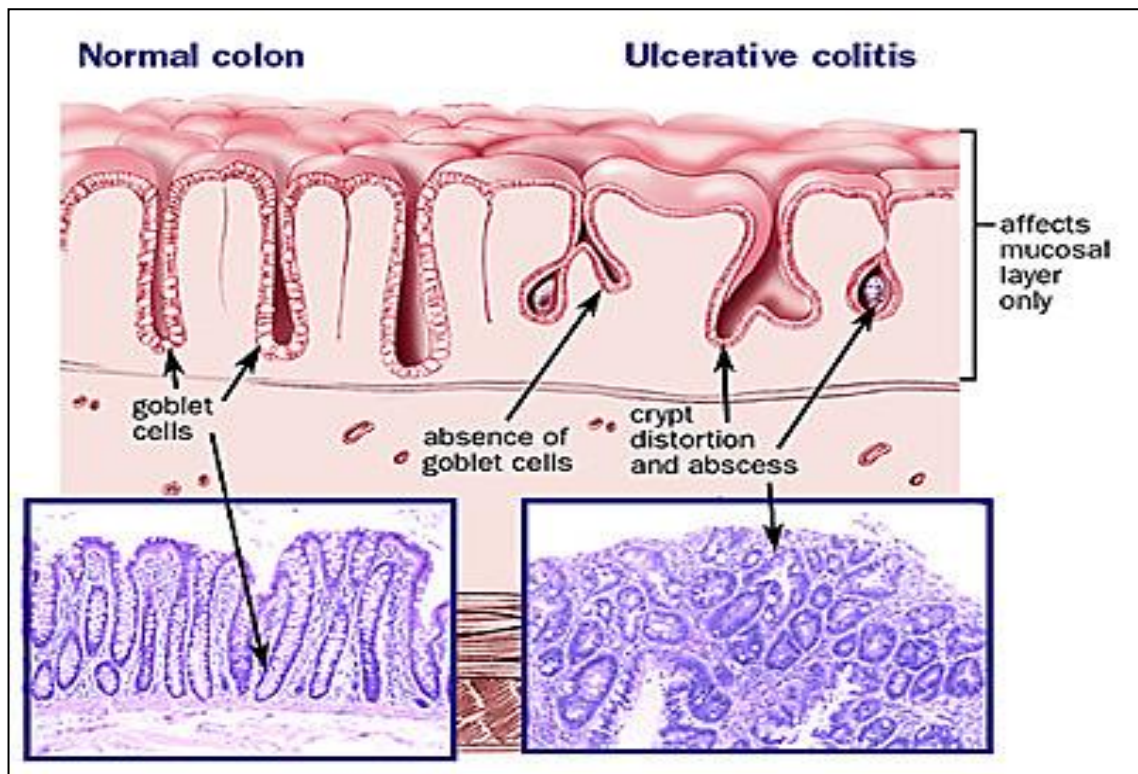


Figure 3 : La lésion histologique (microscopique) typique de la rectocolite hémorragique est l'abcès de la crypte, dans lequel l'épithélium de la crypte se décompose et la lumière se remplit de cellules polymorphonucléaires. La lamina propria est infiltrée de leucocytes. Au fur et à mesure que les cryptes sont détruites, l'architecture muqueuse normale est perdue et les cicatrices qui en résultent raccourcit et peut rétrécir le côlon [36].

- Les différents types de la RCUH

L'atteinte digestive au cours de la RCUH est une atteinte systématique du rectum associée ou non à une extension au reste du côlon, faisant distinguer différentes formes [37] (Figure 4).

- a) Proctite ulcéreuse, qui se limite au rectum
- b) La proctosigmoidite, touche le rectum et le côlon sigmoïde ;
- c) La colite distale, s'étend du rectum jusqu'au côlon descendant ;
- d) La pancolite, touche le côlon en entier

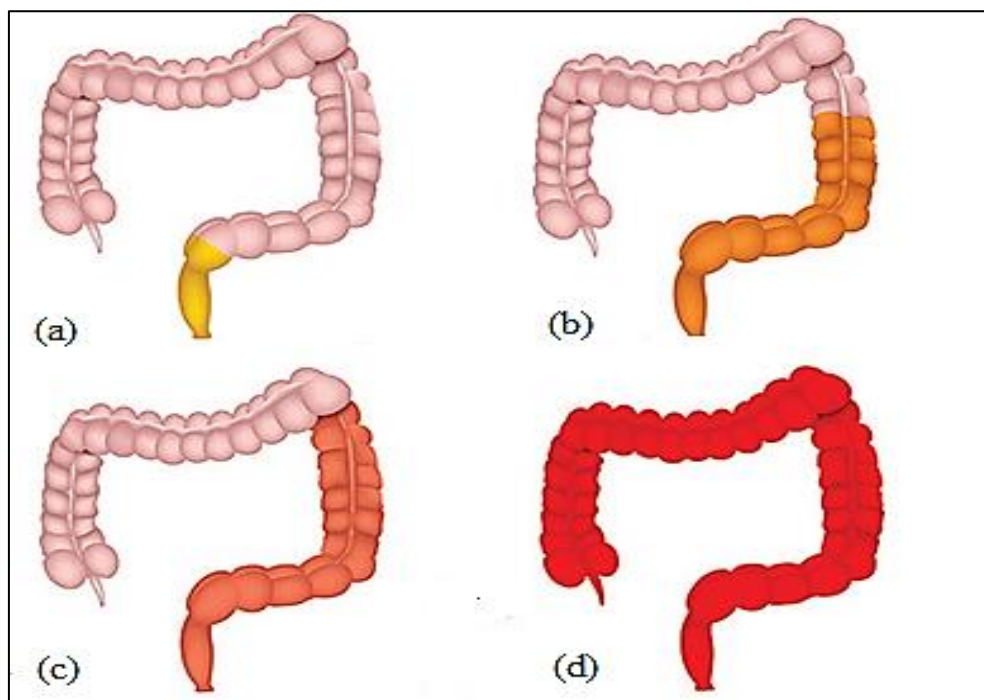


Figure 4: Les différentes formes de la RCUH. Proctite ulcéreuse (a), Proctosigmoidite(b), Colite distale(c) et Pancolite(d) [38].

1.3.2. Etiologie et épidémiologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Les MICI sont souvent diagnostiqués avant l'âge de 30 ans. Le pic d'âge se situe entre 15 et 30 ans, bien qu'il puisse survenir à tout âge [39]. Les causes des MICI ne sont pas entièrement comprises [31, 40] et l'étiologie est considérée comme multifactorielle [39, 41, 42]. Les facteurs associés sont le dysfonctionnement de la barrière, le dérèglement immunitaire du microbiome intestinal et la prédisposition génétique [39, 41, 43, 44]. Il existe également des facteurs de risque environnementaux, tels que le tabagisme, l'appendicectomie, le régime alimentaire, les infections, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les antibiotiques. Cependant, les résultats liés à ces facteurs sont inconsistants [45, 46]. La prévalence et l'incidence des MICIs sont les plus élevées dans les pays occidentaux, avec des taux d'incidence de pointe au Canada et en Europe du Nord [47, 48]. L'Asie a une prévalence plus faible, mais les recherches ont révélé que lorsqu'un individu émigre d'un pays à faible incidence vers un pays à incidence élevée, le risque de développer une MICI est le même que celui de la population du pays à incidence élevée. De plus, les enfants d'immigrants de première génération semblent avoir une incidence plus élevée de MICI que les membres des Premières Nations [49]. Environ un million de personnes aux États-Unis souffrent de MICI [50] et les taux d'incidence sont de 9-20 cas / 100 000 habitants pour les MC et de 10-20 cas / 100 000 habitants pour les RCUH [51, 52]. Dans les pays nordiques, l'incidence de

la MC est de 5 à 8 cas / 100 000 et de la RCUH 12-14 cas / 100 000 [53]. A Constantine 299 cas de MICI ont été enregistrés entre l'année 2003 et l'année 2007 comportant 180 cas de MC (60,20 %) contre 100 cas de RCUH (33,44 %) et 19 cas de colites chroniques inclassables (6,35%), l'incidence moyenne brute enregistrée chaque année (pour 100000 habitants) été de 5.87 pour la MC et 3.29 pour la RCUH, le taux d'incidence le plus élevé était de 21,21 et il a été enregistré dans la tranche d'âge 35-39 ans et pour la RCUH était de 17,34 dans la tranche d'âge 50-54 ans, le rapport H/F était de 1,11 pour la MC et de 1.27 pour la RCUH [54].

1.3.3. Epidémiologie de la rectocolite ulcéro-hémorragique

L'aspect épidémiologique montre aussi que l'environnement et la génétique peuvent être impliqués dans le développement de la rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH). La colite ulcéreuse peut apparaître à tout âge [55, 56]. La RCUH peut se générer à n'importe quel moment de vie, cette affection touche préférentiellement les individus entre 20 et 29 ans et des fois même aux alentours de 60 ans avec une légère prédominance masculine [57]. Les Juifs américains d'origine européenne sont quatre à cinq fois plus susceptibles de développer la RCUH que la population générale. Des études ont montré qu'environ 20 à 25 % des patients peuvent avoir un proche parent atteint de la maladie de Crohn ou de la colite ulcéreuse [58]. La RCUH est remarquée principalement dans les pays développés. Il est rare de trouver un cas de RCUH en Europe de l'Est, en Asie, en Amérique du Sud et dans d'autres régions du monde sous- développé [59]. Il y a des différences importantes entre les populations ethniques avec certains (comme les Juifs ashkénazes) ayant une incidence singulièrement élevée. C'est un trouble mondial marqué par des zones à forte incidence comprenant le Royaume-Uni, les États-Unis, le nord de l'Europe et l'Australie. Les zones de faible incidence englobent l'Asie, le Japon et l'Amérique du Sud [60, 61].

La distribution géographique de la RCUH à travers le globe terrestre est inégale malgré qu'elle soit une pathologie ubiquitaire. L'incidence annuelle de cette maladie est élevée en Amérique du Nord et en Europe, plus faible en Asie et au Moyen- Orient et basse en Amérique du sud ainsi que l'Afrique du nord (qui commence à prendre de l'ampleur) [57]. Les pays en voie de développement voient l'incidence de la RCUH augmenter ces dernières années [62].

La variabilité de l'incidence et la prévalence de la RCUH dépend de l'âge, du sexe et de la localisation géographique [63].

1.3.4. Etiologie et pathogénie

Etiologiquement, La RCUH est définie comme une maladie dont l'étiologie est imparfaitement connue. Cependant, plusieurs facteurs contribuent au développement de la RCUH, tels que l'environnement, la tendance génétique et l'immunologie. Les principales théories comprennent l'infection, l'allergie à la composante alimentaire, la génétique, les facteurs environnementaux et la réponse immunitaire aux bactéries ou autres antigènes [64] (Figure 5).

a)- Facteurs environnementaux

Des études montrent que les agents environnementaux (alimentation, stress, médicaments) jouent un rôle important dans l'initiation de l'expression de la RCUH [65]. Récemment, plusieurs facteurs modifiant la maladie ont été identifiés, tels que l'alimentation, les épices, les antibiotiques, la nutrition infantile moderne, le stress, le tabagisme, les conditions hygiéniques et sanitaires, l'utilisation d'autres médicaments, etc [66].

b)- Facteurs génétiques

L'implication de la génétique dans l'étiologie des MICI en générale et de la RCUH particulièrement a été suggérée par la présence d'agrégats familiaux de RCUH. Lorsqu'un parent est atteint de la RCUH, les risques de développement de la maladie chez ses apparentés au premier degré ont été estimés à 1,6 % et à 36 % lorsque les deux parents sont atteints [67]. De plus, des études génétiques et des modèles murins ont mis en évidence le rôle des prédispositions génétiques et leurs effets sur les interactions avec les facteurs microbiens et environnementaux, entraînant des perturbations pro-colitogènes de la relation hôte-commensal [41].

L'inflammation intestinale est le résultat d'une altération entre la flore intestinale et les cellules de la lamina propria, dans un contexte de polymorphisme génétique affectant la fonction de la barrière épithéliale, ainsi que la réponse immunitaire innée et adaptative [68].

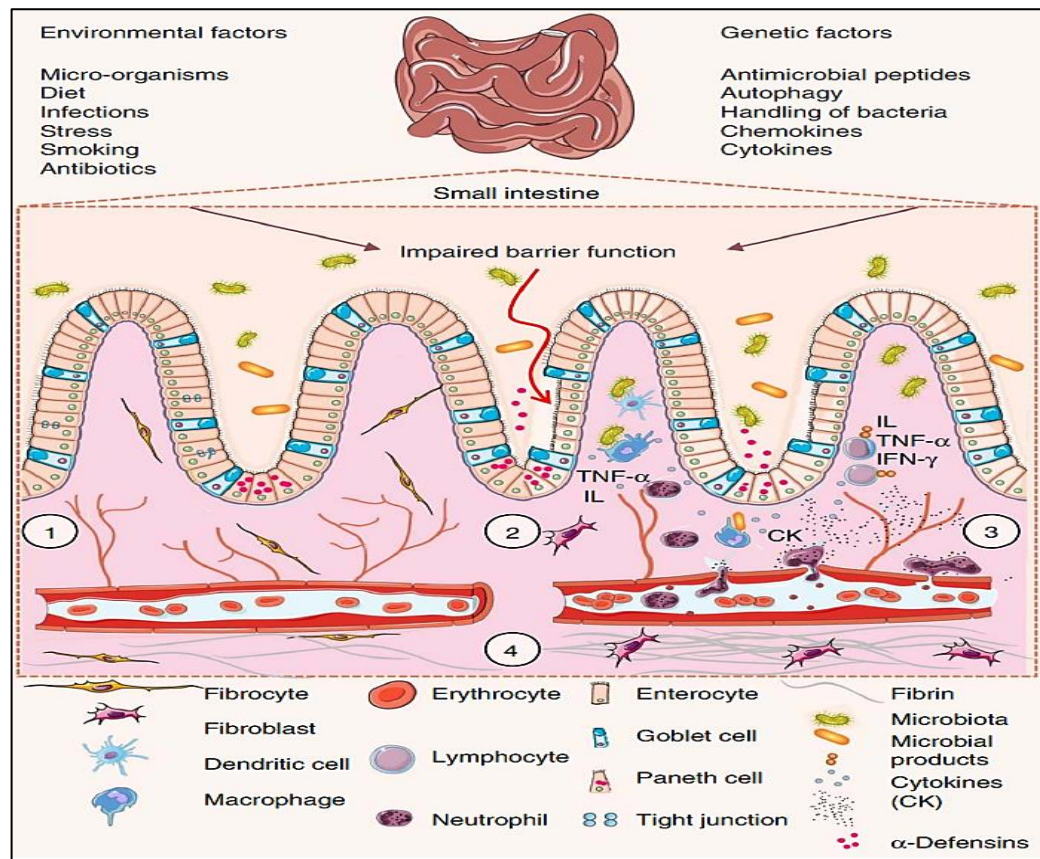


Figure 5 : Physiopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin. (1) Les villosités et les glandes intestinales, ainsi que la lamina propria, le tissu lymphoïde associé à l'intestin et la muqueuse musculaire, constituent les caractéristiques essentielles de la muqueuse de l'intestin grêle. Les glandes sont composées d'un épithélium cylindrique simple qui est continu avec l'épithélium des villosités. Les cellules de l'épithélium intestinal comprennent les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules entéroendocrines et les cellules M. Jonctions serrées dans les entérocytes établissent une barrière entre la lumière intestinale et le compartiment intercellulaire épithélial. (2) Les facteurs génétiques et environnementaux induisent la perturbation de jonctions serrées, provoquant une perméabilité accrue de l'épithélium intestinal et une absorption accrue de bactéries commensales et de produits microbiens. La reconnaissance de ceux-ci par les macrophages et les cellules dendritiques conduit à l'activation des cellules immunitaires et à la production de cytokines (CK). (3) Après activation par les macrophages et les cellules dendritiques, les cellules T produisent diverses interleukines (IL) et $\text{TNF-}\alpha$. (4) Si l'inflammation muqueuse aiguë ne peut pas être résolue par des mécanismes anti-inflammatoires, une inflammation intestinale chronique se développe. À son tour, l'inflammation chronique peut provoquer des tissus [69].

1.4. Physiopathologie de la colite ulcéreuse

1.4.1. RCUH et la réponse Inflammatoire

La réponse inflammatoire excessive au cours de la RCUH peut être expliquée par :

❖ Modification de la barrière épithéliale

La barrière épithéliale intestinale est une ligne de défense immunologique, physiologique et physique, les cellules épithéliales intestinales (CEI) constituent, entre la lumière intestinale et le milieu interne, une barrière physique formée de jonctions intercellulaires serrées et une couche d'un gel de mucine sécrété par les cellules caliciformes des cryptes permettant de garder l'intégrité et l'équilibre intestinale [70].

Les dommages à la barrière épithéliale entraînent une réduction de la sécrétion du mucus (Dans la colite ulcéreuse, la synthèse et l'altération de la sulfatation de certains sous-types de mucine colique (mucine 2) sont diminuées). Ainsi qu'une augmentation de la perméabilité, probablement en raison d'une dilatation des jonctions intra-épithéliales (due à la surexpression de la Claudine 2 dans le cas de la RCUH) [71]. Ceci multiplie l'exposition de la lamina propria à des pathogènes déclencheurs du processus inflammatoire par activation excessive du système immunitaire, et concourt à un relargage important au niveau de la lamina propria de cytokines pro-inflammatoires notamment $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 , IL-6 et l' IL-13 [72, 73] (Figure 6).

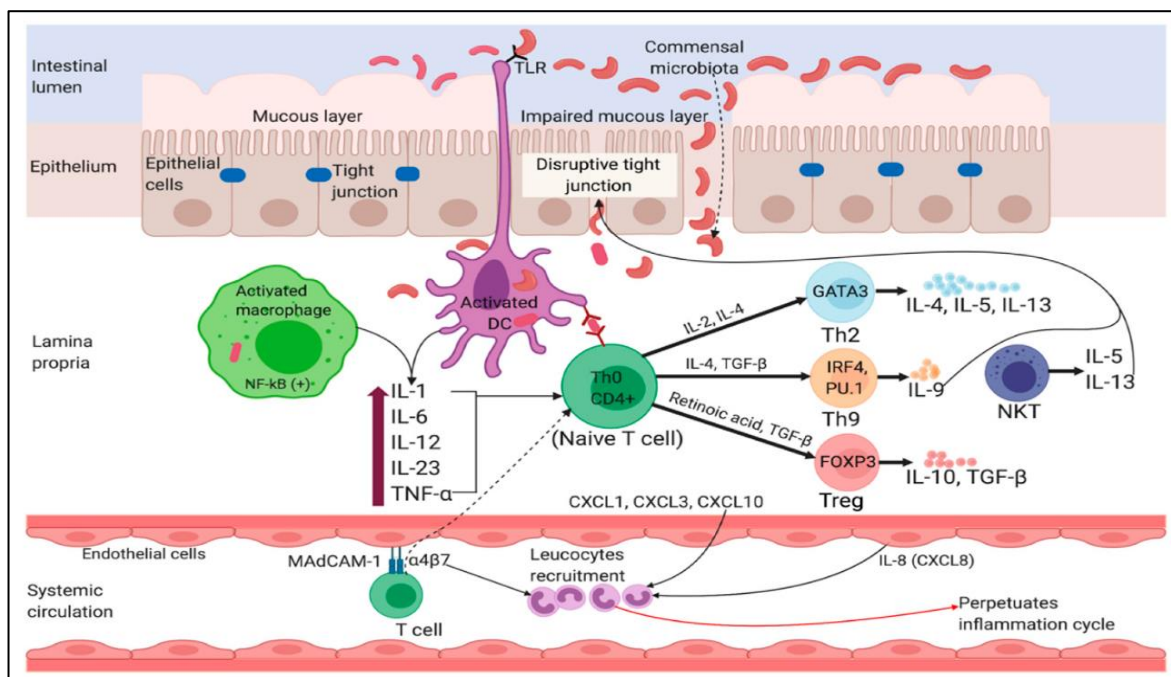


Figure 6: mécanisme de physiopathologie de la RCUH [74].

❖ La dysbiose intestinale

La dysbiose intestinale est définie comme étant un déséquilibre entre les bactéries protectrices et délétères qui composent le microbiote intestinal. Ce déséquilibre influence l'évolution vers la rectocolite ulcéro-hémorragique [75] [76] par la surproduction de cytokines pro-inflammatoires telles que le $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 et la MPO qui amplifie l'inflammation et le stress oxydatif [77].

❖ Le microbiote intestinal.

Le microbiote intestinal montre une diminution de la diversité et un changement dans le profil métabolique, ce qui est indiqué par une diminution en acides gras à chaîne courte. La couche de mucus dans la RCUH est caractérisée par une diminution de la synthèse de la mucine du côlon, la mucine 2. Les modifications du microbiote ainsi que la diminution de la couche de mucus entraînent une brèche de barrière, facilitant l'approche du microbiote à la barrière épithéliale. L'épithélium intestinal est perturbé en raison de foyers d'apoptose et d'une expression de protéines de jonction serrée, permettant ainsi à davantage de microbiotes de traverser la barrière, activant les macrophages et les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et résultant en l'expression de chimiokines qui attirent finalement les neutrophiles. Les neutrophiles construisent la première ligne de réponse cellulaire en formant des pièges extracellulaires de neutrophiles, et les cellules immunitaires s'infiltrant en se liant à la molécule d'adhésion exprimée par l'endothélium des vaisseaux sanguins. Monocytes infiltrants qui mûrissent en macrophages produisent le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'IL-12, l'IL-23 et l'IL-6, ce qui entraîne une polarisation du T helper de type 1 (TH1). De plus, l'IL-36 γ dérivée de l'épithélium inhibe les cellules T régulatrices (Treg) et induit la polarisation de l'IL-17. Il a été démontré que les cellules T auxiliaires productrices d'IL-9 (TH9) et l'IL-36 induisaient des gènes de fibrogenèse. De plus, l'IL-13 libéré par les cellules T tueuses naturelles (NK) s'est avérée contribuer au dysfonctionnement de la barrière (Figure 6) [74].

❖ Les cellules T mucosales

En conditions normales, comme on l'a vu précédemment, la muqueuse intestinale fonctionne avec un équilibre délicat des cellules inflammatoires afin de préserver l'homéostasie alors que lors des pathologies intestinales, la réponse immunitaire est dérégulée face aux antigènes des bactéries commensales, ce qui mène à un déséquilibre du profil de production des cytokines aux différents stades de la maladie [78]. Bien que la réponse immunitaire innée soit principalement impliquée dans l'initiation de l'inflammation du côlon, le rôle de l'immunité adaptative (réponses des lymphocytes T) dans la contribution aux symptômes de la RCUH est significatif [65]

(Figure 7). Une hypothèse répandue sur la pathogenèse de la RCUH et d'autres MICI est que les réponses immunitaires (adaptatives) des lymphocytes T à un sous-ensemble de bactéries entériques commensales sont surexprimées chez des hôtes génétiquement sensibles, où des facteurs environnementaux entraînent l'apparition de la maladie [65].

Bien que la pathogenèse de la colite ulcéreuse n'ait pas été déterminée, une réponse immunitaire muqueuse anormale joue un rôle majeur dans le développement et la physiopathologie de la RCUH [79, 80]. Une infiltration importante de lymphocytes, en particulier de cellules T CD4⁺ [81]. Les cellules T CD4⁺ activées présentent une activité cytotoxique accrue [82] et sécrètent des cytokines qui améliorent l'état inflammatoire entraînant une lésion tissulaire [83, 84]. Bien que le facteur déclenchant de la RCUH soit encore inconnu, le déséquilibre des cytokines et la production de médiateurs inflammatoires par les lymphocytes T CD4⁺ activés jouent un rôle important dans la pathogenèse de la RCUH. Des cellules T auxiliaires de type 2 (Th2) et leurs cytokines, en particulier l'interleukine (IL)-4, ont été suggérées pour améliorer le développement de la RCUH [85], prostaglandine, leucotriène, et les molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) par les cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, neutrophiles, lymphocytes, cellules épithéliales, cellules endothéliales et fibroblastes) [86, 87].

La réponse inflammatoire déclenchée par des stimuli tels que l'endotoxine (lipopolysaccharide de bactéries), les changements dans les niveaux d'ERO qui sont reconnus par les cellules immunitaires à travers des récepteurs transmembranaires spécifiques (tels que les récepteurs Toll-like (TLR)) [86]. Les interactions des récepteurs avec les stimuli activent les voies de signalisation intracellulaires qui conduisent à la dégradation de IκB et la translocation du facteur de transcription (NF-κB) au noyau, provoquent également l'induction des voies Mitogen-activated protein kinases (MAPK) et l'activation du facteur de transcription (AP-1). Les facteurs de transcription sont ensuite transloqués dans le noyau pour lier les régions du promoteur du gène et réguler la transcription des gènes codant pour les médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF-α, IL-1b, IL-6, IL-8, iNOS, ICAM-1, VCAM-1 et COX-2 [87].

Les NOSs, ainsi que les cytokines pro-inflammatoires ont une implication de longue date à la fois dans l'étiologie et la progression de la RCUH. Une infiltration significative par les neutrophiles et une augmentation des niveaux de myeloperoxydase (MPO) ont été observées dans la lamina propria inflammée de l'homme avec une RCUH proche de l'épithélium [66]. Il a été également démontré chez la souris que l'apparition et la sévérité de la colite étaient significativement atténuées par l'ablation du gène iNOS [85].

Dans la RCUH, l'iNOS est considéré comme responsable d'une production fortement accrue de NO dans l'épithélium et dans les foyers d'inflammation en association avec la nitrotyrosine. Le NO dérivé d'iNOS stimule la production de TNF-α dans le côlon intermédiaire et distal, ce qui

favorise l'infiltration des neutrophiles par exemple par stimulation de la synthèse de la molécule d'adhésion intracellulaire (ICAM) et de la P-sélectine, entraînant des lésions tissulaires du côlon. Le recrutement de neutrophiles et l'activation de voies de signalisation transcriptionnelles clés comme le NF- κ B et la AP-1 augmentent la réponse inflammatoire et les lésions tissulaires. Lorsqu'il est activé, le NF- κ B se déplace vers le noyau, se lie à l'ADN et active ensuite l'expression du gène. Les gènes activés impliqués dans l'inflammation des muqueuses comprennent les cytokines IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, TNF- α et ICAM [85, 88] ont documenté une activation accrue de NF- κ B et des taux élevés d'expression de l'ARNm de l'interleukine IL-1 β et de l'ARNm de l'IL-8 dans le tissu RCUH humain [89].

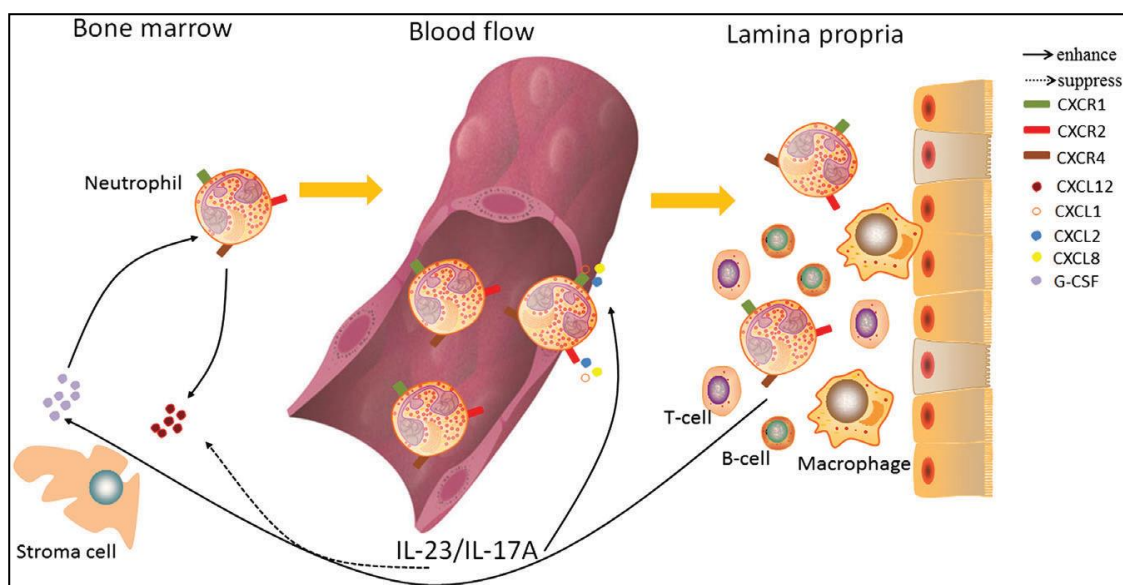


Figure 7 : Régulation de la migration des neutrophiles lors d'une inflammation aiguë. Les neutrophiles sont produits dans la moelle osseuse, et se mobilise vers le sang périphérique sous la régulation de CXCR1 et CXCR2. Dans des conditions inflammatoires aiguës des maladies inflammatoires de l'intestin, les niveaux d'interleukine (IL)-23 et d'IL-17A sont significativement augmentés, ce qui favorise davantage la transcription du facteur de stimulation des granulocytes (G-CSF) dans la moelle osseuse. Augmentation du niveau de G-CSF directement ou indirectement contribue à la libération des neutrophiles de la moelle osseuse vers le sang périphérique. Après transendothéliale et transépithéliale migration, les neutrophiles arrivent à la lamina propria et participent à l'induction de la réponse immunitaire dans la muqueuse intestinale [90].

1.4.2. RCUH et Stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des formes chimiques hautement actives qui ciblent les macromolécules, telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques, entraînant une peroxydation des lipides, un dysfonctionnement des protéines et des mutations de l'ADN [91]. Le stress oxydatif dérivé du déséquilibre entre la production de ERO et le système antioxydant

est nuisible, étant un facteur pathogène important de la RCUH [92] (Figure 8). Des signes indiquent qu'il existe un lien entre la rectocolite ulcéro-hémorragique et le stress oxydatif [93]. La génération des ERO résulte de l'activation des cellules du système immunitaire y compris les neutrophiles ce qui peut avoir un impact important sur la promotion d'évènements inflammatoires qui contribuent à des défenses immunitaires, mais aussi à des dommages de tissus [94] (Figure 9). Lors d'une inflammation, plusieurs mécanismes enclenchent l'activation et le recrutement des neutrophiles tels que la cascade du complément, IL8, TNF α et l'IL1 [95]. 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 [96, 97]. L'envahissement des neutrophiles vers le côlon enflammé est l'une des caractéristiques de la colite ulcéreuse [98] où leur infiltration est accompagnée par la libération de la myéloperoxydase (MPO), appartenant à la superfamille des peroxydases [99, 100]. 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 [101].

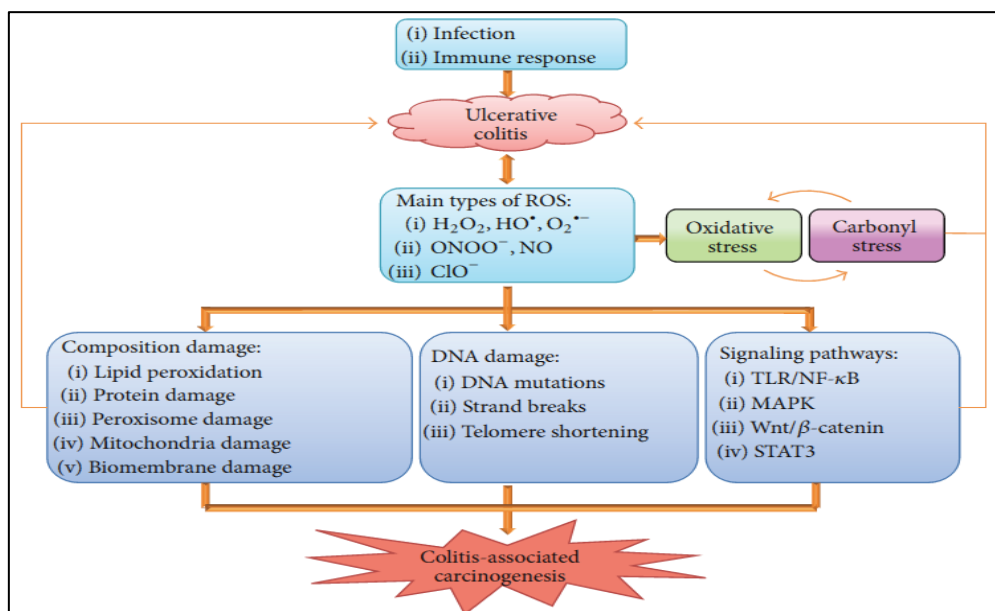


Figure 8: Modèle de stress oxydatif dans la RCUH. Infection et la réponse immunitaire agit comme initiateur primaire pour déclencher l'inflammation et l'infiltration cellulaire inflammatoire. Dans ce processus, la crypte muqueuse intestinale des abcès se produit et de vastes espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites, entraînant ainsi un stress oxydatif [102].

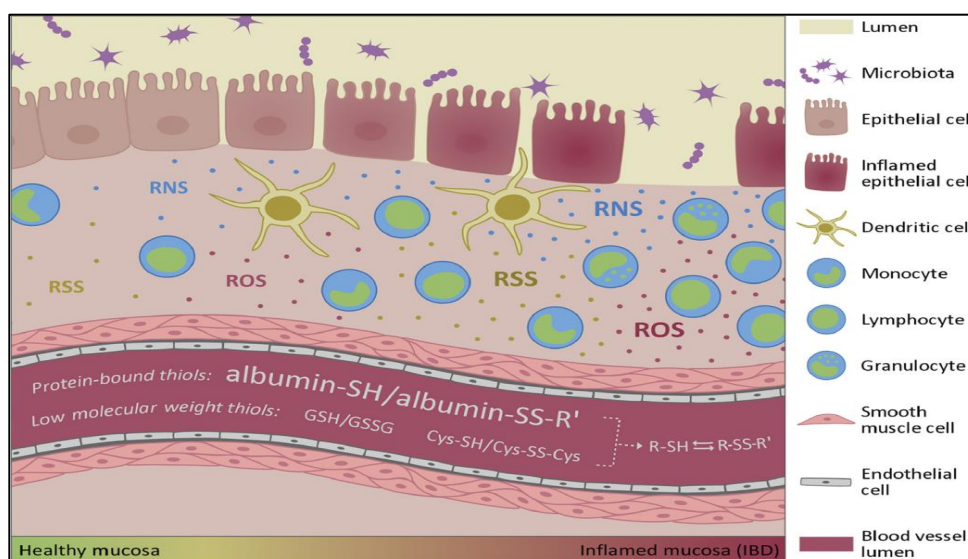


Figure 9 : Interface entre l'interaction des espèces réactives intestinales et l'état d'oxydo-réduction systémique dans la muqueuse intestinale saine et inflammée. Les thiols libres extracellulaires sont représentés par les thiols de haut poids moléculaire (ou cystéine libre), dont la somme est collectivement appelée thiols libres totaux. Ceci s'accompagne de lésions tissulaires collatérales (par exemple, lésion des cellules épithéliales et/ou augmentation de la perméabilité intestinale) et des perturbations de la physiologie gastro-intestinale. [102]

1.5. Modèles expérimentaux de la colite ulcéreuse

A. Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)

- Le TNBS induit une inflammation colique diffuse, caractérisée par une infiltration leucocytaire accrue, un œdème et une ulcération [103]
- ce modèle a été spécifiquement lié à la maladie de Crohn chez l'homme [104, 105]
- c'est un modèle très utile et est fréquemment utilisé dans l'étude de nombreux aspects de l'inflammation intestinale, y compris le modèle de sécrétion de cytokines, l'adhésion cellulaire et l'immunothérapie [106].
- Généralement, il implique une application rectale de faible dose (100 µl de 0,5 mg de TNBS dans 50 % d'éthanol) pour induction de la colite qui peut entraîner une colite transmurale chronique avec diarrhée sévère, perte de poids et prolapsus rectal [107, 108].

B. Dextran Sodium Sulphate (DSS)

- La colite induite par le sulfate de sodium dextran (DSS) est un modèle reproductible qui ressemble morphologiquement et symptomatiquement à la colite ulcéreuse chez l'homme [109]
- le modèle DSS de la colite est l'un des modèles largement utilisés car il peut être facilement développé en raison de la grande disponibilité et du faible coût du DSS.
- le DSS provoque notamment une colite aiguë morphologiquement et macroscopiquement caractérisée par hyperémie, ulcérations, œdème sous- muqueux modéré à sévère, lésions accompagnées de modifications histopathologiques incluant l'infiltration de granulocytes dont les symptômes se traduisent finalement par une diarrhée sanglante [110, 111].
- Le DSS entraîne une augmentation significative de la production de toutes les cytokines pro- inflammatoires dans le côlon moyen et le côlon distal, mais la colite ulcéreuse induite par le DSS semble être plus sévère dans le côlon distal [112].

C. Oxazolone

- généralement utilisé pour induire une colite chez la souris afin d'étudier les processus pathologiques impliqués dans la perpétuation de la colite ulcéreuse.
- Oxazolone est spéculé qu'il intervient dans la réponse immunitaire dirigée par Th2. Par conséquent, en se basant sur les manifestations de l'inflammation des muqueuses, des micro-ulcérations épithéliales et des modifications histopathologiques dans le côlon distal.
- Il a été décrit que l'oxazolone induit une colite chez les rongeurs qui imite la colite ulcéreuse humaine [113, 114].

D. Acide acétique

- La colite induite par l'acide acétique est couramment utilisée et forme un modèle facilement inductible [115].
- La colite induite par l'acide acétique est un modèle de MICI qui ressemble beaucoup à la MICI humaine en termes de pathogenèse, de caractéristiques histopathologiques et de profil de médiateur inflammatoire [116, 117].
- L'administration intra-rectale d'une solution diluée d'acide acétique provoque une inflammation non-transmurale caractérisée par une infiltration accrue des neutrophiles dans le tissu intestinal, une nécrose massive des couches muqueuses et sous-muqueuses, une dilatation vasculaire, un œdème et une ulcération sous-muqueuse qui sont des caractéristiques de la colite humaine [118].

- 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 [119].

E. Les peptidoglycanes

- Le peptidoglycan-polysaccharide est un composant de la paroi cellulaire de la bactérie et possède peut-être une propriété immunogène lorsqu'il est administré à des souris et peut conduire à l'activation de la réponse immunitaire à médiation des cellules T [120].
- Il a été documenté que le peptidoglycane- polysaccharide, lorsqu'il est administré à des souris, provoque l'activation du système kallikréine- kinine; la kallikréine ainsi libérée est chimiotactique pour les neutrophiles [121]. De plus, l'activation de ce système entraîne une libération augmentée de la bradykinine [122] qui provoque ensuite la stimulation des cytokines inflammatoires, par ex. IL-1 et, par conséquent, peut favoriser la progression de l'inflammation dans l'intestin. Une production accrue de NO après administration de PG-PS a également été rapportée [123].

F. Carraghénane

- Le carraghénane est un polysaccharide sulfaté de haut poids moléculaire obtenu à partir d'algues rouges. Sur la base du degré de sulfatation et de solubilité, il est classé en trois sous-types distincts, c'est-à-dire kappa, iota, lambda.
- Le carraghénane lui-même n'est pas très nuisible, mais les produits obtenus après une hydrolyse modérée provoquent des ulcérations dans le côlon de diverses espèces animales, y compris des rats.
- Un modèle de MICI induite par le lambda-carraghénane permet l'évaluation séquentielle des changements histopathologiques et morphologiques dans l'intestin au fil du temps et imite la colite ulcéreuse humaine [124, 125].
- Le modèle lambda-carraghénane de l'inflammation intestinale est choisi pour sa facilité de préparation et son absence d'inconfort pour les animaux impliqués [126].

Les lésions intestinales se développent progressivement en 2 à 4 semaines, mais ne sont décelables qu'après 8 semaines chez des rats nourris au lambda-carraghénane et se révèlent morphologiquement similaires à ceux observés dans la colite ulcéreuse humaine [127]. Il est tout à fait possible que le potentiel ulcérogène du carraghénane puisse être dû à la présence de polyanions électronégatifs [128].

G. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

Les manifestations coliques de la pathologie liée aux AINS comprennent des modifications inflammatoires, des ulcères solitaires ou multiples, des rétrécissements (parfois semblables à des diaphragmes), une colite ischémique, une hémorragie colique et une colite éosinophile [129, 130]. L'effet des AINS sur le côlon est moins bien reconnu.

1.6. Approches Thérapeutiques et effets Secondaires

Il n'y a pas de traitement qui permette de guérir la RCUH, mais plusieurs médicaments sont utilisés dans le but, d'une part clinique, avec un contrôle des symptômes et une amélioration de la qualité de vie, et d'autre part, endoscopiques afin d'obtenir une cicatrisation muqueuse (Figure 10).

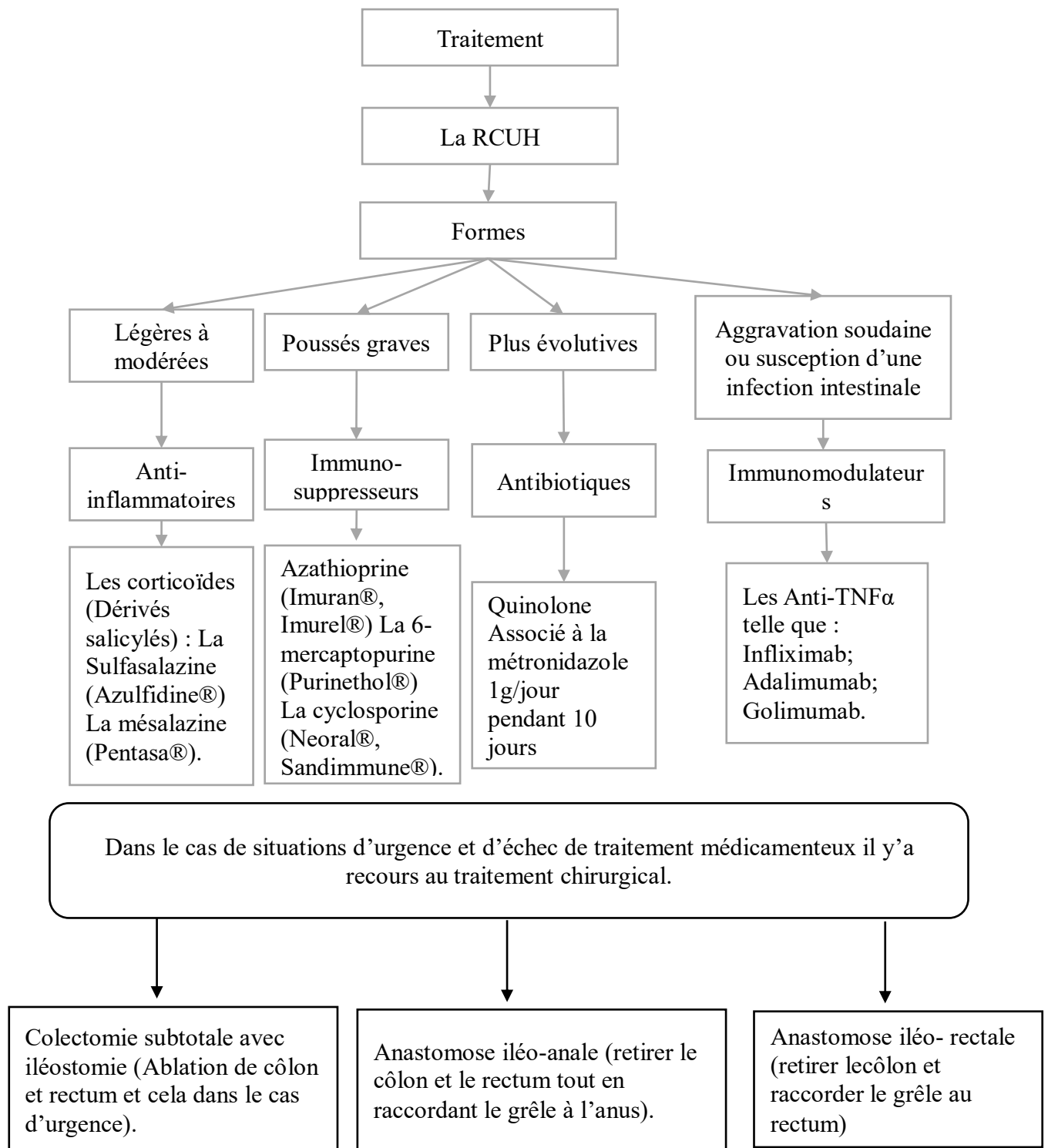


Figure 10 : Organigramme des soins des patients atteints de la RCUH [131] [132] [133] [134].

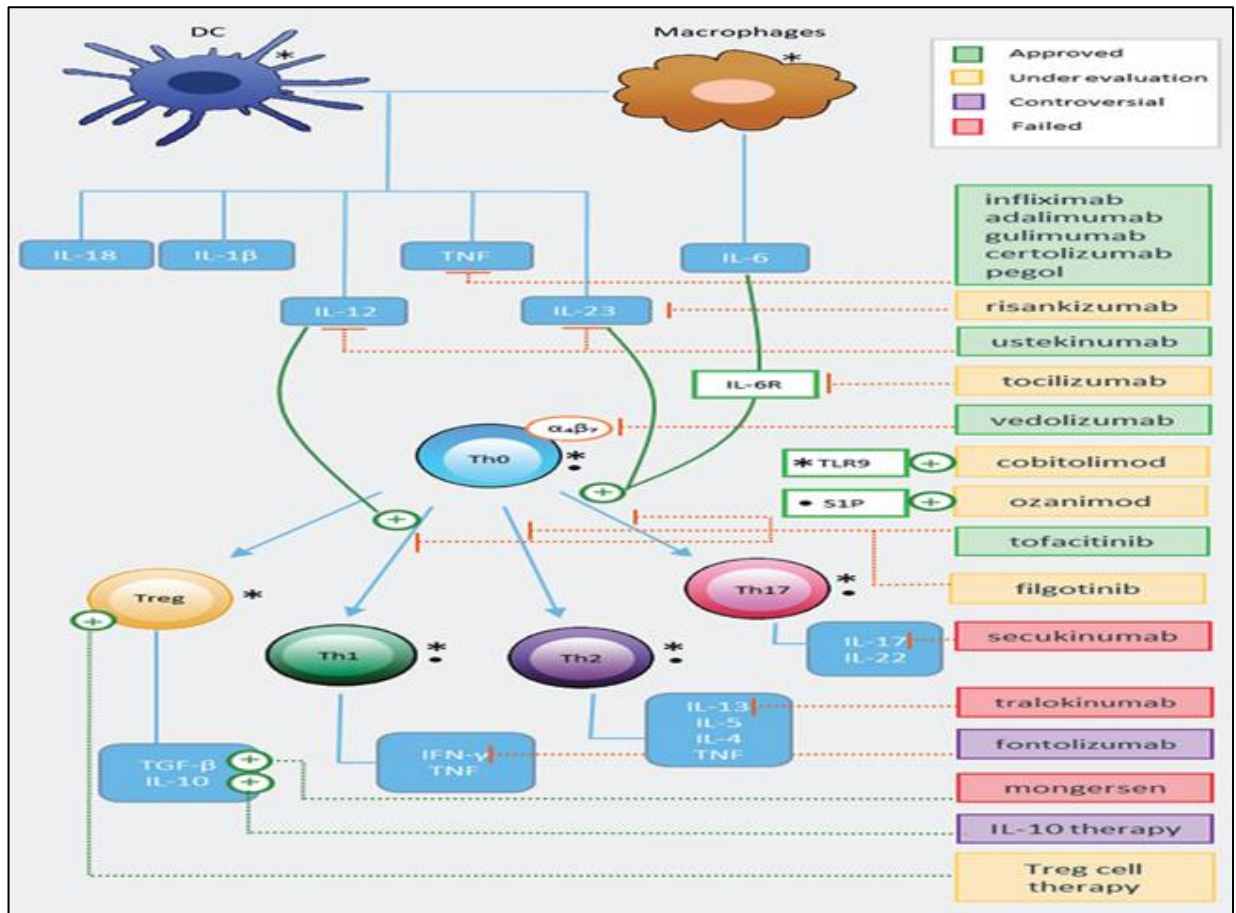


Figure 11: Approches thérapeutiques des MICI. L'immunomodulation thérapeutique pour les MICI peut avoir divers stades de cascade inflammatoire. Actuellement Les thérapies ont réussi à cibler le TNF, avec l'utilisation de l'infliximab, de l'adalimumab, du certulizumab pegol et du golimumab ; et l'orientation des lymphocytes T vers l'intestin, avec l'utilisation de vedolizumab bloquant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$. Les médicaments récemment approuvés, l'inhibiteur de JAK tofacitinib et le bloqueur de la sous-unité IL-12/23 p40 ustekinumab, interfèrent avec la différenciation des cellules T effectrices. Les stratégies thérapeutiques en cours d'approbation comprennent les thérapies à base de cytokines tels que l'inhibiteur de la sous-unité IL-23 p19, le risankizumab et le tocilizumab, l'antagoniste de l'IL-6R, le modulateur du homing des lymphocytes ozanimod, l'inhibiteur sélectif de JAK1 filgotinib, l'agoniste TLR9 cobitolimod et les thérapies à base de cellules Treg. Les thérapies controversées comprennent la neutralisation de l'IFN- γ avec le fontolizumab et la thérapie à l'IL-10 humaine recombinante. Dernièrement, des approches ayant échoué pour cibler l'IL-17A avec le sécukinumab, l'IL-13 avec le tralokinumab et le SMAD7 avec le mongersen sont également présentées. CD : cellule dendritique ; IL : interleukine ; TNF : facteur de nécrose tumorale ; IL-6R : récepteur de l'interleukine 6 ; $\alpha 4\beta 7$: intégrine ; TLR9 : récepteur de type Toll 9 ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; Th : cellule T auxiliaire ; Treg : cellule T régulatrice ; TGF- β : facteur de croissance transformant- β ; IFN : interféron [135].

Tableau 2 : les effets secondaires des traitements médicamenteux.

Traitement	les effets secondaires
Les immunosuppresseurs	diminuent les symptômes mais risquent d'induire des pneumopathies, un lymphome et cancer cutané [136].
Les anti-inflammatoires	ralentissent l'évolution de la maladie sans la guérir dont les corticoïdes arrêtent l'évolution chez un patient sur quatre mais entraînent des risques oculaires : Cataracte et glaucome, insuffisance de la glande surrénale, les nausées, les vomissements et une déminéralisation osseuse [137].
les inhibiteurs du TNF- α	associés à une grande variété d'effets secondaires dermatologiques, comme les infections cutanées locales, le psoriasis et l'eczéma [138] [139].

2. Les algues

2.1. Généralités sur les algues

Les algues, que l'on nomme aussi phycophytes, sont des thallophytes photosynthétiques que l'on rencontre dans les milieux aquatiques d'eau douce ou marin, ainsi que dans certains milieux terrestres. Leur appareil végétatif d'où le nom de ce taxon végétal est dérivé s'appelle thalle. Le thalle se caractérise par l'absence des organes spécifiques (racine, tige, feuille). Les cellules des algues possèdent les mêmes éléments structuraux que celles des plantes supérieures. Elles sont dotées d'une paroi cellulaire cellulosique, des petits noyaux et des plastides ou chromatophores contenant de la chlorophylle souvent dissimulée par des pigments auxiliaires qui donnent aux thalles des couleurs spécifiques [141].

2.2. Classification des algues

Le thalle algal se caractérise par une variabilité immense, aussi bien en forme qu'en dimension. Il peut être constitué d'une seule cellule comme il peut atteindre plusieurs dizaines de mètres de longueur [142]. Généralement les algues se divisent en trois classes principales: les chlorophycées (algues vertes), les rhodophycées (algues rouges) et les phaeophycées (algues brunes) [143] et se développent en abondance dans les milieux aquatiques marines [144].

2.3. Les algues rouges (Rhodophycées)

Les algues rouges (Rhodophycées) se distinguent des autres algues par la présence de pigment bleu, phycocyanine, et pigment rouge phycoérythrine, en plus de la chlorophylle *a*. Ces pigments constituent un grand avantage parce qu'elles absorbent la lumière bleu-vert dans les eaux profondes et transmettent l'énergie à la chlorophylle *a* pour la production de composées via le processus de la photosynthèse. Les algues rouges vivent à la fois en haut sur le rivage et à grande profondeur. Chez les espèces habitant les eaux profondes domine le pigment rouge par contre chez les espèces présentes dans les eaux intertidales domine le pigment jaunâtre, brun rougeâtre ou presque noir, c'est pourquoi de nombreuses algues rouges sont confondues avec les algues brunes de couleur jaune brun [145].

Les algues rouges peuvent s'adapter aux différents types de stress physiques qu'elles rencontrent dans leurs biotopes. Ceux qui vivent en hauteur sur le rivage sont adaptés pour résister à une dessiccation sévère à marée basse et sont souvent grands et plats pour absorber le maximum de nutriments et de lumière solaire pour la photosynthèse qu'ils ne sont submergés. Le composant gélose leur permet de retenir de l'eau et réduire le dessèchement. Certaines algues rouges poussent

de manière épiphyte sur les varechs et se sont tenues à la lumière du soleil et délicatement ramifiées pour couler avec de l'eau alors que les varechs se balancent dans les vagues. La majorité de ce groupe sont pluricellulaires et marines, bien qu'il existe certains espèces unicellulaires et d'autres qui vivent en eau douce. Elles se divisent en deux groupes : celui des Bangiophycées (qualifiées de primitives) et celui des Floridéophycées (plus complexes). Elles se distinguent généralement par leur cycle de reproduction particulièrement complexe [146].

2.3.1. Domaine d'application des algues rouges

Les algues rouges ouvrent de nombreuses perspectives pour la recherche et pour de nombreux secteurs économiques, au nombre de cinq : l'alimentation, la santé, les biocarburants de seconde et surtout de troisième génération, l'environnement et l'industrie. A cela, il faut rajouter d'autres activités comme la cosmétique.

Parmi les rhodophycées les plus valorisées, on trouve les genres tels *Gelidium*, *Gracilaria* et *Gracilariopsis*, sources de trois des polysaccharides essentielles: l'agar, l'alginate et les carraghénanes, qui sont dotés de propriétés épaississantes et gélifiantes [147]. Ces polysaccharides sont exploités aussi bien dans le domaine agroalimentaire que dans le domaine médical et industriel. Les rhodophycées sont devenues une ressource capitale pour la production de ces polysaccharides.

Les rhodophycées sont aussi impliquées d'une manière profonde à la santé, plusieurs espèces contiennent des immunostimulants, des agents antiviraux et antibactériens, des agents anticancéreux ou antiproliférateurs, des agents anticoagulants et anti-inflammatoires, ainsi que des antioxydants puissants et des antiradicalaires [148] ou encore des agents anti-nociceptifs [149].

. 2.4. *Gelidium sp.*

Parmi les algues rouges les plus recherchées commercialement le genre *Gelidium* Iyer [150]. Les espèces de *Gelidium* sont habituellement utilisées dans l'industrie des phycocolloïdes pour la production des polysaccharides [151, 152]. Ainsi, plusieurs espèces de *Gelidium* telles que *Gelidium pacificum*, *Gelidium sesquipedale*, *Gelidium latifolium*, *Gelidium rex*, *Gelidium pusillum* et *Gelidium amansii* ont fait l'objet de plusieurs travaux visant leur exploitation commerciale dans la production des polysaccharides [153, 154].

Les bioproduits actuellement obtenus à partir des espèces *Gelidium* n'incluent pas seulement les phycocolloïdes mais aussi d'autres nouveaux produits tels les composés bioactifs et les fibres. [155, 156, 157, 158].

Les espèces *Gelidium* croissent lentement en culture et est basée sur le prélèvement de

populations naturelles [153]. Les populations de *Gelidium* ont été exploitées dans Espagne, Portugal, Maroc, Chili, Afrique du Sud, Corée du Sud, Japon et Mexique [153, 159]. Les perspectives de ce groupe d'algues pour la biotechnologie les applications sont encourageantes et le potentiel de culture de ce genre est élevé [160], mais plusieurs problèmes doivent être abordés afin d'obtenir des résultats rentables, en particulier dans les pays en développement qui ont une technologie obsolète La majorité des espèces de Gelidiales ont des rendements en gélose d'environ 20–30 % [161].

3. Les polysaccharides

3.1. Généralités sur les polysaccharides

Le polysaccharide est le nom donné à une macromolécule se composant d'un grand nombre de résidus de monosaccharide jointés entre eux par des liaisons glycosidiques. Les polysaccharides sont des polymères des monosaccharides liés par des liaisons glycosidiques, généralement subdivisés en trois groupes : les polysaccharides de structures des parois cellulaires, Les mucopolysaccharides, et les polysaccharides de réserve [162]. Les polysaccharides des parois cellulaires et de réserve sont spécifiques aux genres et aux espèces et espèce et possèdent diverses activités biologiques [163]. Les polysaccharides sulfatés bioactifs trouvés dans les algues rouges sont principalement des galactanes (agars, carraghénanes) composés d'une manière complète de galactose ou d'unités galactose modifiées. Les algues rouges contiennent encore les xylanes, l'amidon l'oridien et la porphyrine qui sont des mucopolysaccharides [164].

Les polysaccharides qui se composent d'un seul type de monosaccharide sont appelés homopolysaccharides (homoglycanes). Ceux composés de deux monosaccharides différents sont appelés hétéropolysaccharides (hétéroglycanes). Les propriétés de biocompatibilité et la nature non toxique de ces polysaccharides offrent une plateforme plus large pour leur utilisation en biomédecine, en particulier l'administration de médicaments et l'ingénierie tissulaire, entre autres applications [165].

3.2. Les types de polysaccharides chez les rhodophycées

Les polysaccharides algaux forment un ensemble diversifié au sein duquel on trouve :

3.2.1. Les polysaccharides de réserve (stockés à l'intérieur de la cellule)

Chez les algues rouges, il s'agit de l'amidon floridéen (polymère du 1,4- α -glucose) [166].

3.2.2. Les polysaccharides de faible poids moléculaire

Ils sont dotés d'une solubilité dans le milieu, ils traversent la membrane pour réguler la pression osmotique. Chez les algues rouges, on distingue plusieurs espèces dont deux isomères: le floridoside et l'isofloridoside qui coopèrent à la régulation osmotique [166].

3.2.3. Les polysaccharides de structure

Les polysaccharides de la paroi cellulaire sont appelés polysaccharides pariétaux, ils

englobent deux phases [166]:

- **La phase squelettique.** Elle sert uniquement à la structure et elle est constituée de polysaccharides insolubles (cellulose, mannanes, xylanes).
- **La phase matricielle :** Elle renferme des polysaccharides de structure plus hydrosolubles noyés dans la matrice (ou zone amorphe), dans laquelle se déroulent les échanges cationiques.

Il a été rapporté que plusieurs polysaccharides bioactifs possèdent des activités anti-inflammatoires, antithrombotiques, antioxydantes, antidiabétiques et anticancéreuses. Les principales espèces rhodophycées marines produisant des polysaccharides dotés d'effets biologiques sont référenciées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Les espèces rhodophycées marines produisant les polysaccharides bioactifs [167]

Espèces	Ordre	Type des PS	Action/ Application
<i>Porphyra</i> spp.	Gelidiales	S-galactan porphyran	Antitumor, hypotensive, regulates blood cholesterol [167, 168]
<i>P. haitanensis</i>		sPS	Antioxydant [169]
<i>P. yezoensis</i>		Porphyran	Antitumor, immunomodulatory, hypolipidaemic [170, 171] 172, 173]
<i>Gelidium crinale</i>		di-S-galactan	Anticoagulant [174, 175]
<i>Pterocladia capillacea</i>		S-agarans and hybrid DL-galactans	Antiviral [176]
<i>Bostrychia montagnei</i>	Ceramiales	S-agarans	Antiviral [177]
<i>Cryptopleura ramose</i>		S-agarans	Antiviral [178]
<i>Digenea simplex</i>		S-agarans	Antiviral [179]
<i>Corallina</i> sp.	Corallinales	LMW-PS	Antiviral [180]
<i>Cryptonemia crenulata</i>	Cryptonemiales		Antiviral [181]
<i>Gloiopeltis complanata</i>		S-agarans	Antiviral [168]
<i>G. furcate</i>		Agaroid-carrageenan	Antiviral [182]
<i>Chondrus crispus</i>	Gigartinales	S-agarans S-galactans	Antiviral [174, 175]
<i>C. ocellatus</i>		S-X-carrageenan	Antiviral, anticoagulant, antithrombotic [183, 184, 185, 186]
<i>Euchema cottonii</i>		LMW-sPS	Antitumor [187]
<i>E. spinosa</i>		S-galactans	Antioxydant [188]
<i>Furcellaria lumbricalis</i>		S-x-carrageenan	Anticoagulant, anti-thrombotic [183, 184, 185, 186]
<i>Gigartina acicularis</i>		LMW-sPS	Immunostimulant [189]
<i>G. skottsbergii</i>		S-galactans	Antioxydant [188]
<i>Gymnogongrus torulosus</i>		S-carrageenans	Antiviral, anticoagulant [190, 186, 191, 192]
<i>Hypnea charoides</i>		Hybrid DL-galactans	Antiviral [193]

<i>Kappaphycus striatus</i>		LMW-PS	Antiviral [177]
<i>Phyllophora brodiei</i>		LMW-S-carrageenans	Antitumor, immunomodulator [183, 186]
<i>Phyllophora chordalis</i>		S-X-carrageenan	Anticoagulant, antithrombotic[190, 186, 194]
<i>Stenogramme interrupta</i>		LMW-SPs	Immunostimulant [195]
		S-carrageenans	Antiviral [190, 186, 196]
<i>Gracilaria caudate</i>			
<i>G. corticata</i>	Gracilariales	sPS	Antioxydant [188]
<i>G. verrucosa</i>		S-agarans S-galactans	Antiviral [197]
		Sps	Immunomodulator[197]
<i>Grateloupia indica</i>			
	Halymeniales	S-galactan	Anticoagulant, antithrombotic[194]
<i>Nemalion helminthoides</i>			
<i>Nothogenia fastigiata</i>	Nemaliales	S-mannans	Antiviral [198]
		Xylogalactans , S-xylomannans	Antiviral, anticoagulant [199, 200, 201]
<i>Schizymenia dubyi</i>			
<i>S. pacifica</i>	Nematomatales	S-galactans	Antiviral [202]
<i>S. binderi</i>		S-)carrageenan	Antiviral [190, 186, 203]
		S-galactan	Anticoagulant [204]
<i>Botryocladia occidentalis</i>			
<i>Champia feldmannii</i>	Rhodymeniales	di-S-galactan; LMW-sPS	Anticoagulant; anti-venom [205, 206]
		LMW-carrageenans	Antitumor [190, 186, 207]
<i>Sebdenia polydactyla</i>	Sebdeniales	S-xylomannans	Antiviral [208]

3.3. Les polysaccharides sulfatés chez les rhodophycées

3.3.1. L'agar agar

La gélose est un mélange de polysaccharide principalement composé d'agarose et d'agropectine. Il est doté de propriétés de structure et de fonction similaires à celles du carraghénane. L'agar est les polysaccharides sulfatés extrait des phaeophycees, il est également extrait rhodophycées telles que *Gelidium sp.* et *Gracilaria sp.* [209]. L'utilisation de ce composé est principalement dans les domaines commerciaux et scientifiques en raison de sa propriété d'émulsion gélifiante et de viscosité. L'agar est un nom générique de galactanes d'algues contenant des résidus $\alpha(1-4)$ -3, 6-anhydro-L-galactose et fi 9(1-3)-D-galactose avec une estérification de la sulfatéine en petite quantité allant jusqu'à 6 % [210]. La gélose de qualité modique est utilisée dans les produits alimentaires comme les bonbons, les jus de fruits, les aliments surgelés, le glaçage de boulangerie, les meringues, les gels de dessert, etc. L'agar a également une application industrielle comprenant le revêtement de papier, les adhésifs, la teinture d'impression textile, les impressions, le moulage, etc. La gélose de qualité moyenne est utilisée dans les milieux de culture biologique comme substrat de gel. Ils sont également importants et utilisés dans le domaine médical et pharmaceutique en tant qu'agents de charge, agent anticoagulant, laxatifs, gélules et

comprimés L'agar hautement purifiée (agarose) est utilisée en biologie moléculaire pour les techniques de séparation telles que l'électrophorèse, l'immunodiffusion et la chromatographie sur gel. L'agar affecte l'absorption des rayons ultraviolets [211], il peut diminuer le taux de glucose dans le sang et exerce également un effet anti-agrégation sur les globules rouges. Il a été mentionné que l'agar-oligosaccharide supprime la production d'une cytokine pro-inflammatoire et supprime également l'enzyme associée à la production d'oxyde nitrique [212]. Le polysaccharide de type gélose qui est extrait à l'eau froide d'une espèce de *Gracilaria* a prouvé une activité anti-tumorale. Comme l'agar appartient aux hydrosylates, il peut former des agaro-oligosaccharides dotés d'une activité antiglycosidase et un pouvoir antioxydant [213]. La qualité de la gélose et son contenu sont liés à ses propriétés physicochimiques qui dépendent intimement aux paramètres environnementaux, à la période de croissance et au cycle de reproduction. Certaines études ont montré que la gélose pourrait être utilisée dans les domaines médicaux et pharmaceutiques pour le traitement contre les cellules cancéreuses, dans la mesure où elle peut induire l'apoptose chez ces cellules *in vitro* [214].

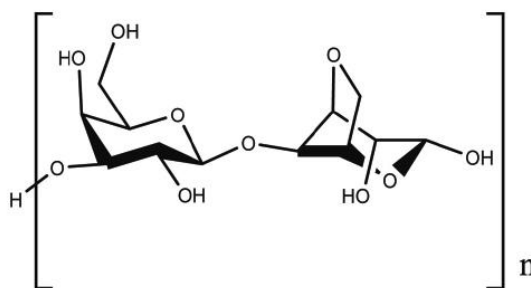


Figure 12 : structure moléculaire de l'agar-agar [210].

3.3.2. La carraghénane

Le terme carraghénane est le nom générique de la famille des galactanes sulfatés hydrosolubles naturels. Il a un squelette alternatif constitué de α (1-4)-3, 6-anhydro-D-galactose et (1-3)-D-galactose [215]. Le carraghénane est largement utilisé après la gélose comme émulsifiant et stabilisant dans de nombreux aliments, en particulier les produits à base de lait. Le K- et l'i-carraghénane sont très utilisés dans les produits laitiers tels le chocolat, les gels pour desserts, les crèmes glacées, les gelées, les confitures, le lait évaporé, etc. vu sa propriété d'épaississeur et de suspension. Commercialement les carraghénane divisent en cinq types : A-carraghénane, i-carraghénane, K-carraghénane, p-carraghénane, v-carraghénane. Selon le taux de sulfate il y a une grande différence qui est de 20% (w/w) en K-carraghénane et 40% (w/w) en A-carraghénane. Ceci est due à la différence entre les espèces ainsi qu'aux conditions d'extraction. De point de vue biologique, le p-carraghénane et le v-carraghénane sont le précurseur du K- et i-carraghénane; Ils

peuvent être transférés dans la sulfotransférase et la sulfohydrolase [216, 217]. Le carraghénane peut être utilisé également comme produit pharmaceutique potentiel en tant qu'agent antitumoral, antiviral, anticoagulant et immunomodulateur [218, 219]. Le carraghénane peut se dissoudre dans l'eau en raison du groupe de biomolécules composé d'une chaîne polysaccharidique linéaire avec des demi-esters sulfate attachés à l'unité sucre. Les carraghénanes sont utilisés également en médecine comme anticoagulant dans les produits sanguins et dans le traitement des problèmes intestinaux tels la diarrhée, la constipation et la dysenterie. Ils sont encore utilisés pour faire des cataplasmes internes pour contrôler les ulcères d'estomac. De nouvelles recherches des propriétés biocides montrent que le gel de carraghénane de *C. crispus* peut bloquer la transmission du virus VIH ainsi que d'autres virus MST tels la gonorrhée, les verrues génitales et les virus de l'herpès simplex (HSV) [220, 221].

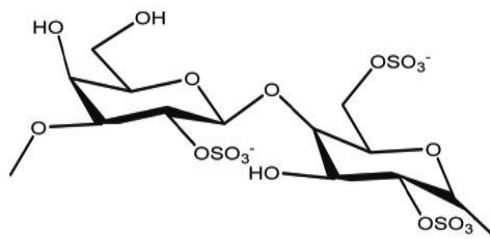


Figure 13: structure chimique de la carraghénane [215].

4. Les effets des polysaccharides issus des algues marines sur la RCUH

4.1. Polysaccharides algaux et RCUH

Les polysaccharides sulfatés (PLS) des algues rouges représentent un outil pharmacologique important, en raison de leur structure spécifique ainsi que leur contenu élevé en groupements sulfates. De ce fait, ils présentent des activités antioxydantes [222], des effets gastroprotecteurs [223] et anti-inflammatoires [224, 225].

Plusieurs études ont montré que les PLS originaires des rhodophycées marines sont dotés des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires [226] via leur pouvoir à diminuer la production et la libération de médiateurs des radicaux libres et ils protègent l'organisme vivant vis-à-vis des dommages [227]. D'autres études ont montré que le prétraitement avec PLS réduisait de manière dose-dépendante les dommages intestinaux macroscopiques après administration intracolonne de TNBS. [228].

En raison des effets secondaires associés aux traitements conventionnels, la recherche de nouvelles sources de médicaments améliorant les symptômes cliniques des MICI reste une des priorités majeures. Les progrès récents dans l'étude de la pathogenèse des MICI ont ouvert des perspectives pour le développement de nouvelles stratégies de traitement visant des cibles thérapeutiques associées à l'utilisation de produits naturels efficaces qui peuvent bloquer l'adhésion et la migration des leucocytes dans la muqueuse intestinale enflammée et inhiber les cytokines, normaliser la microflore intestinale, maintenir la rémission clinique et accélérer la cicatrisation muqueuse intestinale [229, 230]. À cet égard, les algues marines peuvent représenter une bonne bioressource d'ingrédients naturels [231].

Les activités biologiques des polysaccharides sont attribuées à leur composition en monosaccharides, à leur poids moléculaire, aux types de liaisons et à la conformation de leurs chaînes glucidiques [232]. Un grand nombre de données expérimentales indique que les polysaccharides d'origine algale ont un effet anti-inflammatoire et gastroprotecteur prometteur pour le traitement et la prévention des maladies gastro-intestinales [233, 234].

4.1.1. Les polysaccharides et les voies pro-inflammatoires

4.1.1.1 Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines ne sont pas seulement à l'origine de l'inflammation intestinale et de la diarrhée dans les MICI, mais elles peuvent également réguler la maladie extra-intestinale et les effets systémiques. Des études réalisées à partir de tissus des patients atteints de MICI et de modèles animaux de MICI ont identifié le spectre des cytokines comme des nouvelles cibles potentielles

pour le traitement de l'inflammation intestinale [235]. Ces cibles comprennent l'IL-17, le principal facteur pathogène des MICI, qui stimule une forte réponse immuno-inflammatoire chronique [236], les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-12, IL-23 et IL-21, ainsi que les cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et le TGF- β [237].

Le rôle clé des cytokines est également mis en évidence par le fait que le blocage du TNF. Les polysaccharides d'algues sont des prometteurs en tant qu'alternative thérapeutique pour les patients atteints de MII, car ces composés modulent de nombreux mécanismes et médiateurs pro-inflammatoires, y compris la régulation de l'expression génétique des cytokines pro- et anti-inflammatoires liées à la colite ulcéreuse ([238, 239].

Le polysaccharide d'algue rouge *H. musciformis* réduit l'infiltration des neutrophiles et les niveaux de cytokines dans la colite induite par le TNBS, une étude a montré que le prétraitement par PLS (60 mg/kg, p.o.) de l'algue rouge *H. musciformis* réduit de manière dose-dépendante les dommages intestinaux macroscopiques, produit un effet protecteur dans le modèle de colite induite par le TNBS et prévient l'augmentation des taux de MPO colique par la modulation de la migration des neutrophiles dans le côlon enflammé [228]. La migration des neutrophiles dans le côlon au cours de la colite est accompagnée par la production de plusieurs produits inflammatoires, tels que la génération de radicaux libres et la libération de cytokines pro-inflammatoires. Le traitement avec PLS (60 mg/kg, p.o.) issue de *H. musciformis* réduit significativement les concentrations de ces cytokines (IL-1 β et TNF- α) dans la muqueuse intestinale enflammée. Brito et al. [240] ont démontré que le PLS 90 mg/kg issu de l'algue rouge *Gracilaria birdiae* diminuait la concentration de cytokines dans la muqueuse intestinale enflammée. Les cytokines, telles que l'IL-1 β et le TNF- α , qui sont augmentées dans les tissus enflammés (les lésions de la muqueuse dans les MICI) [241].

4.1.1.2. Les molécules d'adhésion intercellulaire et lymphocytes-endothéliaux

Les interactions médiées par les molécules d'adhésion, telles que les sélectines, les intégrines, les cadhérines, etc., jouent un rôle important dans la migration et l'implication des leucocytes dans les foyers d'inflammation et peuvent également être utilisées comme cibles thérapeutiques potentielles pour l'inflammation intestinale chronique [242]. Les sélectines qui se lient aux résidus terminaux de mannose et de fucose des polysaccharides et des glycoconjugués ralentissent le roulement des leucocytes et des plaquettes à la surface de l'endothélium des parois des vaisseaux, facilitant ainsi la transmission transendothéliale [243, 244] ont également constaté que l'administration intraveineuse de fucoïdan réduisait les lésions de la muqueuse colique et la destruction de la crypte dans la colite chronique murine induite par le DSS en abolissant le roulement des leucocytes dans les veines et le recrutement extravasculaire. Ces résultats prouvent que les polysaccharides sulfatés, possédant les propriétés des glycosaminoglycanes mimétiques,

bloquent les molécules d'adhésion et inhibent la migration des leucocytes, ayant un effet positif dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin [245].

4.1.1.3. Cellules épithéliales intestinales (CEI)

Les polysaccharides d'algues peuvent diminuer l'inflammation intestinale et améliorer la fonction de barrière en régulant partiellement les composés denses diminuant l'inflammation intestinale et en améliorant la fonction de barrière en régulant partiellement les composés denses et les protéines associées (claudine, occludine). D'autres études sur d'autres Protéines liées à la jonction serrée permettront d'établir le mécanisme d'action exact des polysaccharides et de confirmer leur intérêt potentiel en tant qu'agent thérapeutique approprié pour le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin [245].

4.1.1.4. Espèces actives d'oxygène et NO

Le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogenèse et la progression des MICI. Plusieurs rapports de la littérature ont montré une augmentation des formes actives d'oxygène et d'azote chez les patients atteints de MICI [246] ainsi que dans des modèles de colite induites chez la souris [247]. Une protection antioxydante défectueuse est un autre facteur clé contribuant à la progression des MICI [246]. À cet égard, les stratégies thérapeutiques potentielles pour les MICI visant à impliquer l'utilisation des composés antioxydants naturels et synthétiques sont examinées et discutées revues [248]. Des études récentes ont montré que les polysaccharides de *H. musciformis* réduisent le stress oxydatif dans la colite induite par le TNBS. Pour cela, deux marqueurs du stress oxydatif ont été étudiés, la concentration de malondialdéhyde (MDA) et les niveaux de glutathion (GSH). Le MDA est un produit des processus lipoperoxydatifs qui ont lieu à la suite de l'agression oxydative colique [249]. Les concentrations d'antioxydants endogènes tels que le GSH sont considérablement réduites chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin et dans les modèles expérimentaux de colite [250]. Cependant, le prétraitement par les PLS 60 mg/kg a rétabli les niveaux de GSH et diminué les concentrations de MDA dans les tissus enflammés et a diminué les dommages de la muqueuse agissant dans la production et l'action des antioxydants endogènes.

D'autres études ont montré que les PLS extraits de l'algue rouge marine *Gracilaria birdiae* ont démontré des effets antioxydants et anti-inflammatoires, diminuant la production et la libération des piègeurs de radicaux libres et prévenant les dommages oxydatifs dans l'organisme vivant. Une étude a démontré, pour la première fois, l'efficacité de l'action des PLS extraits de *Gracilaria birdiae* contre les dommages colon induits par le TNBS sur les examens macroscopiques et histologiques chez les rats [226, 227], dans ce contexte Brito et al. ont étudié

trois marqueurs de stress oxydatif : GSH et MDA et la concentration de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$. Les concentrations d'antioxydant endogène (GSH), ont diminuées de manière significative chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin et dans les modèles expérimentaux de colite [240]. d'autre études démontrent que le prétraitement par PLS 90 mg/kg (*Gracilaria birdiae*) augmente les niveaux de GSH chez les animaux atteints de colite induite par le TNBS [251, 240]. Le GSH, un antioxydant endogène, protège les cellules contre les dommages oxydatifs et a diminué les dommages de la muqueuse agissant dans la production et l'action des antioxydants endogènes. De plus, le MDA est un produit des processus lipoperoxydatifs. Les résultats ont démontré pour la première fois que le PLS réduit la concentration de MDA dans la muqueuse colique enflammée. Ainsi, la réduction de la réponse inflammatoire dans le côlon par le PLS semble être liée à la diminution du stress oxydatif [240].

Les dommages dans la muqueuse intestinale induits par le TNBS étaient accompagnés de niveaux élevés de radicaux libres dérivés de la dégradation du NO (radicaux NO_3/NO_2 [252]. Le traitement par PLS diminué la concentration de NO_3/NO_2 dans la muqueuse intestinale des rats traités avec le TNBS.

4.1.1.5. Le microbiote

Une grande attention a été accordée à l'utilisation des polysaccharides d'algues comme prébiotiques. Les polysaccharides ont déjà été utilisés comme prébiotiques alimentaires et peuvent être utilisés dans le traitement complexe des MICI. des données montrent que les polysaccharides d'algues ont un grand potentiel d'utilisation comme prébiotiques dans les MICI et peuvent avoir des effets sur la santé, notamment en régulant la composition et les fonctions du microbiote, en abaissant le pH dans la lumière du côlon et en empêchant la colonisation intestinale par des agents pathogènes, et en réduisant la production d'espèces réactives de l'oxygène,. Cependant, des études supplémentaires sur les propriétés prébiotiques des oligo- et polysaccharides d'algues sont nécessaires pour obtenir des informations plus complètes sur leurs avantages intestinaux, y compris dans les MICI [244].

III – MATERIELS ET METHODES

III - Matériels et méthodes

1. Etude phytochimique

1.1. Identification de l'algue *Gelidium spinosum*

➤ Description

Le thalle de consistance cornée ou cartilagineuse, est doté d'une couleur rouge orangé à violé foncé parfois iridescent. Sa taille varie entre 5 et 15 cm, la largeur des axes est de 0.3 à 3 mm, leur épaisseur est relativement constante : de 0.3 à 0.5 mm (Figure 14). Il est constitué d'un système d'axes rampants ou aplatis, ramifiés latéralement qui assurent la fixation de l'algue au substrat par une série de rhizoïdes ou stolons qui portent la fronde dressée avec ses ramifications [253]. La *Gelidium spinosum* vit sur les rochers ou sur d'autres algues au niveau des plus basses mers, dans des zones peu agitées. Cette espèce peut pousser à des profondeurs allant de 5 à 20 m [254].



Figure 14 : Thalle de *Gelidium spinosum* récolté de zone de Beni Belaid (2016) (willaya de Jijel).

➤ Classification:

Domaine : Eukaryota

Règne : Plantae

Sous-Règne : Biliphyta

Phylum : Rhodophyta

Sous-Division : Eurhodophytina

Classe : Florideophyceae

Sous-Classe : Rhodymeniophycidae

Ordre : Gelidiales

Famille : Gelidiaceae

Genre : *Gelidium*

Espèce: *spinosum*

1.2. Site d'échantillonnage

Le site choisi pour la collection de l'espèce *Gelidium spinosum* se trouve dans la wilaya de Jijel qui se situe sur la rive sud du bassin méditerranéen au Nord-Est de l'Algérie. La récolte est effectuée au niveau de la zone de Beni Belaid (position GPS: Altitude: N 36°53'20.74"; Longitude: E 006°07'47.52") (Figure 15) Le site sélectionné est caractérisé par sa richesse algologique, son accessibilité, sa sécurité et sa proximité de la ville De Jijel.

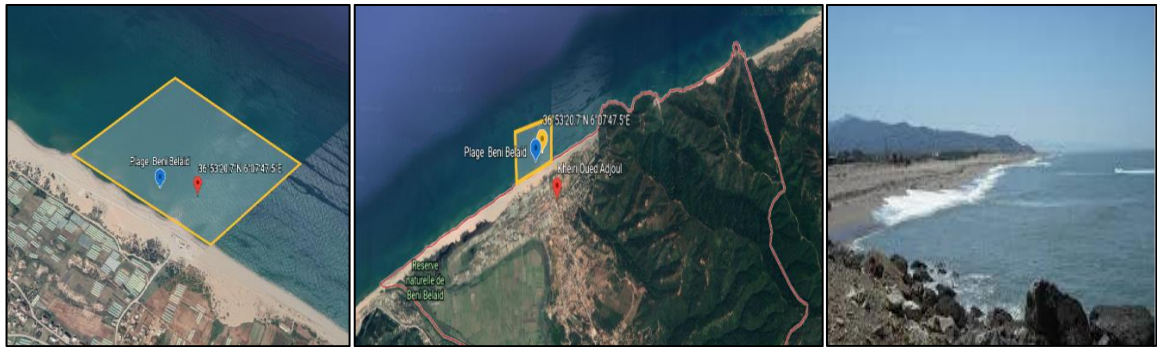


Figure 15: Localisation géographique du site d'échantillonnage (Google Earth, 2021).

1.3. Collecte et traitement des échantillons

Gelidium spinosum a été récoltée au mois de mars 2016. L'algue est prélevée à la main à une profondeur de 20 mètres. L'échantillon recueilli a été lavé sur place avec l'eau de mer, pour éliminer les débris, les petits crustacés et des autres algues. Au laboratoire, les échantillons ont été lavés de nouveau avec de l'eau courante et nettoyés complètement des épiphytes ensuite séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière pour éviter la photolyse, pendant 21 jours. Après le séchage, ils se sont broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre fine à l'aide d'un broyeur mécanique et conservée dans des bocaux fermés hermétiquement et placée dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur, jusqu'à leur utilisation.

1.4. Authentification d'espèce sélectionnée

L'identification taxonomique s'est effectuée au Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine1. Ultérieurement elle fut confirmée par les professeurs associés Nina Lundholm et Ruth Nielsen du Musée d'histoire naturelle du Danemark, Université de Copenhague. Le guide d'identification des espèces pour les besoins de la pêche de la F.A.O (Food and Agriculture Organization) a été utilisé pour l'authentification des espèces collectées [255]. Un article publié récemment dans le site Web « Algabase » par Guiry and .Guiry [256] a été utilisé comme support accessoire dans l'approche taxonomique.

1.5. Extraction des polysaccharides (extrait brut)

40 g de poudre d'algues ont été plongés dans 1: 20 volumes d'eau distillée à 90 °C pendant 3 h. Le mélange a été filtré en utilisant la gaze ; en outre, le surnageant a été séparé du résidu d'algues par centrifugation à 8 000 tr/min pendant 15 minutes. Le résidu a été ré-extrait de la même manière, le surnageant a été combiné et dialysé dans une membrane cellulosique (de poids moléculaire 12 000 KDa) pendant 24 h contre de l'eau distillée. Le polysaccharide a été précipité avec deux fois le volume d'alcool à 95% (éthanol) pendant une nuit, puis centrifugé à 3500 tr/min pendant 30 minutes; le précipité a été lavé avec de l'alcool à (100 °C) puis séché sous un courant d'air chaud de 60 °C[257]. Cette procédure a été répétée en fonction des besoins expérimentaux. L'extrait polysaccharidiques obtenu a été exploité pour les études *in vivo* et *in vitro*.

➤ Calcul du rendement d'extrait polysaccharidique de *Gelidium spinosum* (EPGS)

Le rendement massique, est un rapport entre la masse de l'extrait brut obtenu et la masse de la matière de départ. Il est calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{\text{poids de l'extrait brut de polysaccharides}}{\text{poids de la matière végétale sec}} \times 100 \quad [258]$$

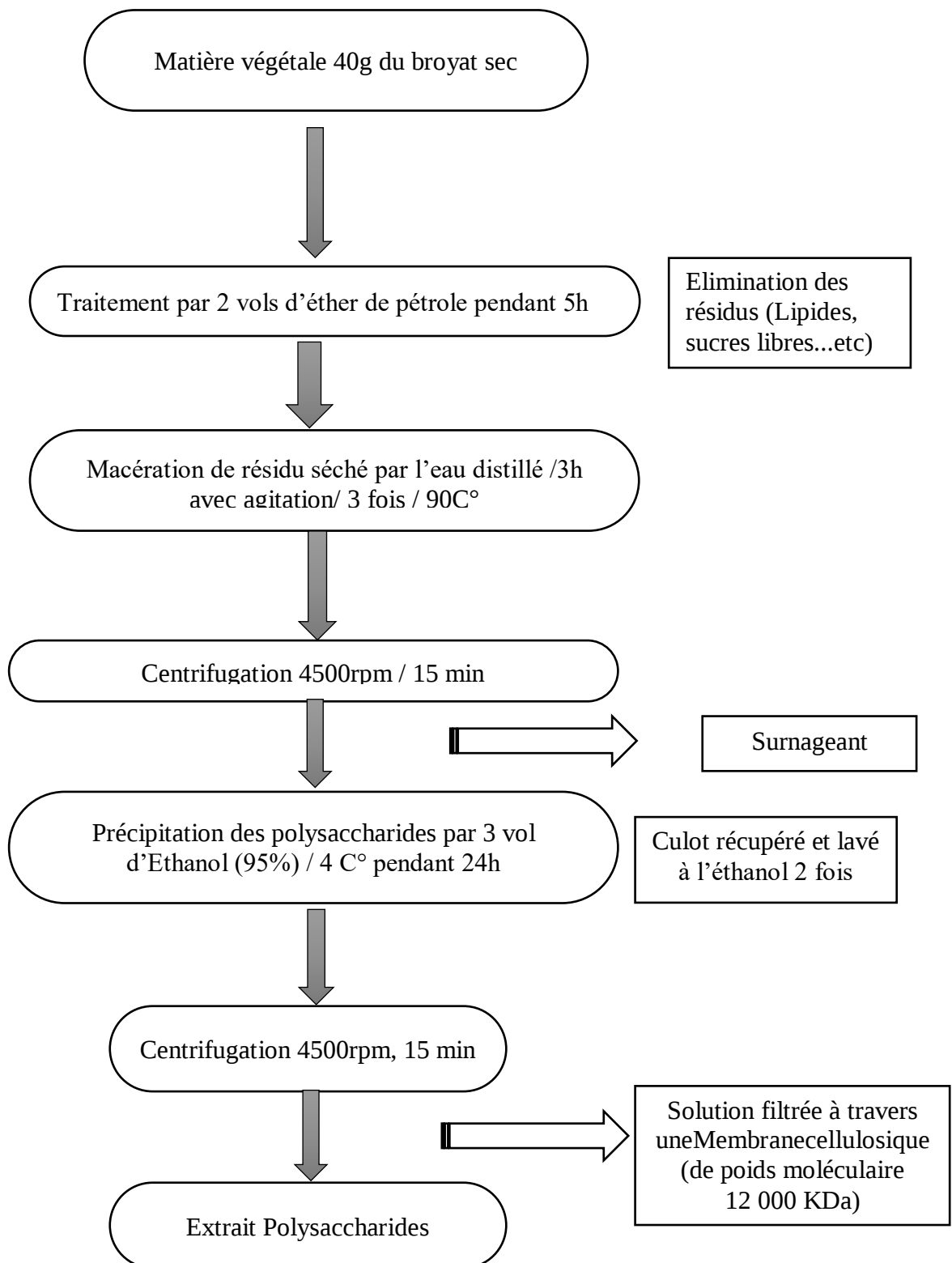


Figure 16 : Protocole d'extraction des polysaccharides.

1.6. Caractérisation des polysaccharides

La détermination de la composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique obtenu de l'EPGS a été réalisée par la combinaison de deux techniques de chromatographies reposant sur les caractéristiques physico-chimiques des molécules (la polarité, l'oxydation et la réduction).

1.6.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) des oses constitutifs d'EPGS

- Hydrolyse et préparation des étalons pour la chromatographie CCM

Afin de déterminer la composition osidique d'EPGS, une hydrolyse acide a été adoptée selon la méthode de Ruiz [259]. 2 mg d'EPGS lyophilisé est hydrolysée par dans un volume de 1 mL d'acide trifluoroacétique (4 M). Le mélange fut incubé à 80 °C pendant 5 heures puis laissé au refroidissement. L'hydrolysate fut collecté après une centrifugation de 5 min à 2000 x g, ainsi, l'acide co-évapore par l'ajout du méthanol (de quelques gouttes). L'hydrolysate final est déposé dans un dessiccateur sous la hotte pendant 24 heures jusqu'à l'évaporation totale [260].

L'identification des monosaccharides de l'hydrolysate est effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des plaque préparées à base de gel de silice (Silica gel 60 F254) de 0.25 mm d'épaisseur sur feuille de verre. Les standards utilisés comme standards sont successivement : le glucose (Glc), le galactose (Gal), l'arabinose (Ara), xylose (Xyl), le mannose (Man) et le rhamnose (Rha), ainsi que deux dérivés monosaccharidiques à savoir l'acide glucuronique (GlcA) et l'acide galactoronique (GalA), préparés à une concentration de 0,5% de chacun. La phase mobile utilisé est constituée d'un mélange d'acétate d'éthyle-pyridine- acide acétique- eau distillée en proportions de 9-3-1-1 (V/V).

- Réalisation de CCM et révélation:

L'analyse qualitative des oses d'hydrolysate fut effectuée en déposant sur la même plaque la série des solutions standards (2 gouttes de chacune) ainsi que la solution d'hydrolysate (4 gouttes) sur la ligne de dépôt à 2 cm du bas de la plaque. Par la suite la plaque fut introduite dans une cuve étanche dont l'atmosphère est saturée par la phase mobile. Le développement du chromatogramme est effectué de façon ascendante jusqu'au front. Après séchage, la révélation fut effectuée en plongeant la plaque dans la solution de révélation (éthanol, acide sulfurique et le thymol) de bas en haut pour une seconde, et en séchant dans l'étuve à 110°C pendant 2 min. [261, 262].

1.6.2. Caractérisation quantitative par HPAEC-PAD

La chromatographie d'échange d'anions à haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD) permet de confirmer les compositions des oses constituant l'EPGS et de définir leurs pourcentages. Les différents oses sont identifiés selon leurs temps de rétention spécifique et leur quantification est déduite via l'intégration du signal (Chromeleon management system Dionex) authentifiés aux monosaccharides de référence préparé chacun à une concentration de 0.01 mg/ml.

- **Préparation des échantillons:**

2 mg d'EPGS sont placés dans des tubes hermétiques pour être hydrolysés par l'acide trifluoroacétique (4 M) pendant 1 heure à 120 °C dans un bain Marie thermostaté. Ils sont ensuite lyophilisés et remis en solution dans 1 ml d'eau distillée [263].

- **Application d'HPAEC-PAD:**

25 µl de l'échantillon sont injectés dans la colonne (type CarboPac PA 1) avec un débit d'élution de 1 ml.mn⁻¹ via un système isocratique d'une solution de NaOH 16 mM (éluent A) pendant 10 mn suivie d'un gradient d'acétate de sodium 600 mM (éluent B) en 4 étapes. A la première étape durant 10 min le système est composé de 0 % B et 100 % A, à la deuxième étape durant 10 à 40 mn il est composé de 0 % à 100 % B, à la troisième étape durant 40 à 45 min il est composé de 100% de B et en fin à la quatrième étape durant de 45 à 60 mn de 100 à 0% de B [264].

2. Etude biologique

2.1. Évaluation de l'activité antioxydant de *Gelidium spinosum*

2.1.1. Evaluation de l'activité antioxydant *in vitro*

Il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer une activité antioxydante [265, 266]. Dans notre étude le choix s'est porté sur le test de l'activité antiradicalaire (DPPH) évaluant la capacité de piégeage des radicaux libres, le test de décoloration des radicaux cationiques ABTS et le test déterminant le pouvoir réducteur.

2.1.1.1. Activité anti radicalaire : test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti-radicalaire a été déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH° [267]. Le DPPH° (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH° est réduit en 2,2-diphényle-1-picrylhydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration qui explique le pouvoir de l'extrait à piéger ce radical. L'intensité de la couleur (coloration jaune pâle) est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [268]. Brièvement, 40 µL d'EPGS à différentes concentrations ont été ajoutés à 160 µL de DPPH° (0,1 mM). Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et l'absorbance du DPPH° restant a été mesurée à 517 nm après 30 min à l'aide de lecteur microplaque. Le BHT et l'α-tocophérol ont été utilisés comme standards antioxydants. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculé par la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}} \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du contrôle négatif (DPPH + méthanol sans extrait)

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon

2.1.1.2. Activité anti radicalaire ABTS:(teste de décoloration du radical cationique ABTS^{°+})

La méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical cation ABTS^{°+}, acide 2-2-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Le radical est formé par l'oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le persulfate de potassium K₂S₂O₈ [269]. L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage ABTS^{°+} a été testée selon Marco (1968) [270] et Öztürk et al. [271]. L'ABTS^{°+} a été produit par la réaction entre 7 mM ABTS^{°+} dans H₂O et 2,45 mM K₂S₂O₈, et stocké dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 h. Avant utilisation, l'absorbance de la solution ABTS^{°+} doit être comprise entre 0,70 - 0,75 nm à 734 nm diluée à l'éthanol. Ensuite, 160 µL de solution ABTS^{°+} ont été ajoutés avec 40 µL de la solution échantillon (à différentes concentrations). Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. L'éthanol a été utilisé comme témoin tandis que le β-glucane (Saccharomyces cerevisiae) a été utilisé comme standard.

L'effet antioxydant d'extrait est exprimé en pourcentage de réduction d'ABTS^{°+} selon la formule suivante:

$$\% \text{ de réduction} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$ = concentration initial d'ABTS^{o+}

$A_{\text{échantillon}}$ = l'absorbance de la concentration restante d'ABTS^{o+} en présence de l'échantillon.

2.1.1.3. Dosage du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) a été déterminé selon la méthode rapportée par Oyaizu (1986) [272]. Le principe de la technique est basé sur la capacité à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le ferricyanure de potassium K₃[Fe(CN)₆] en sel de fer ferreux (Fe²⁺) par les antioxydants présents dans l'extrait algal. Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons. La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺). L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait testé.

10 µL de solutions échantillons ont été mélangés avec 40 µL de tampon phosphate (pH 6,6) et 50 µL de K₃Fe(CN)₆ (1%). Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 minutes. Les solutions obtenues ont été mélangées avec 40 µL d'eau distillée et 10 µL de chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance a été mesurée à 700 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits, le β-glucane a été utilisé comme référence. Une absorbance plus élevée du mélange réactionnel indique un pouvoir réducteur supérieur. Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer \%} = [(A_{\text{test}} / A_{\text{blanc}}) - 1] \times 100$$

A_{test} = l'absorbance en présence de l'échantillon/référence.

A_{blank} = l'absorbance du blanc.

2.1.2. Évaluation de l'activité antioxydant *in vivo*

2.1.2.1. Animaux d'expérimentation

Des souris albinos suisses mâles pesant 25 à 30 g, importées de l'institut de pharmacie (Université de Constantine) ont été utilisées dans l'étude. Toutes les expériences sur les animaux ont respecté strictement la charte sur l'éthique de l'expérimentation animale. Les animaux ont été maintenus dans des cages métalliques pour une période d'acclimatation (2 semaines) avant d'être utilisés dans les expériences. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture de type pastilles sèches et ils sont maintenus dans des conditions habituelles de température (25±2) °C et d'humidité, avec des cycles lumière / obscurité de 12/12 h.

2.1.2.2. Évaluation de la toxicité aiguë de l'EPGS

Cinq souris ont reçu par gavage une dose unique de 2000 mg/kg d'EPGS. Les animaux ont été maintenus à jeun pendant une nuit avant l'administration d'EPGS. Les animaux ont été observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes après l'administration, puis périodiquement pendant les premières 24 heures (avec une attention particulière pendant les 4 premières heures) et quotidiennement pendant une période de 14 jours. Les changements de comportement généraux, les effets secondaires courants tels que la diarrhée légère, la perte de poids ont été contrôlés [273].

2.1.2.3. Induction du RCUH chez la souris

Les ulcérations coliques sont induites chez des souris mâles pesant 28 ± 2 g par l'administration orale de DSS [274]. Nous avons examiné sur ce modèle le degré de protection de la muqueuse colique par cet extrait contre l'attaque de DSS. Un produit pharmaceutique anti-ulcéreux: *Mésalazine* (Acide-5-aminosalicylique) a servi comme drogue de référence. Les procédures expérimentales adoptées dans cette étude étaient en stricte conformité avec les lignes directrices pour la déclaration de la recherche animale [275].

▲ Repartition des groupes

Les animaux ont été divisés en quatre groupes de dix chacun ($n = 10$).

- **Groupe I** : c'est le groupe témoin dont les souris reçoivent quotidiennement, à l'aide du biberon, de l'eau potable pendant 14 jours.
- **Groupe II** : Les souris de ce lot ont reçu quotidiennement l'eau potable durant les 7 premiers jours, puis du DSS (2.5 %, p/v) dissout dans l'eau potable durant les 7 jours suivant pour l'induction du RCUH [274].
- **Groupe III** : Ce lot a comporté les souris qui ont reçu par voie orale 60 mg/kg EPGS dissout dans l'eau potable à l'aide du biberon [228] pendant les 7 premiers jours, puis traité par le DSS (2.5 %, p/v) dissout dans l'eau potable durant les 7 jours succédant pour l'induction du RCUH.
- **Groupe IV** : Ce lot a compris les souris recevant de la mésalazine (5-ASA) à 75 mg/kg [276] pendant 7 jours, puis traité par le DSS (2.5 %, p/v) de la même manière précédente (Figure 17).

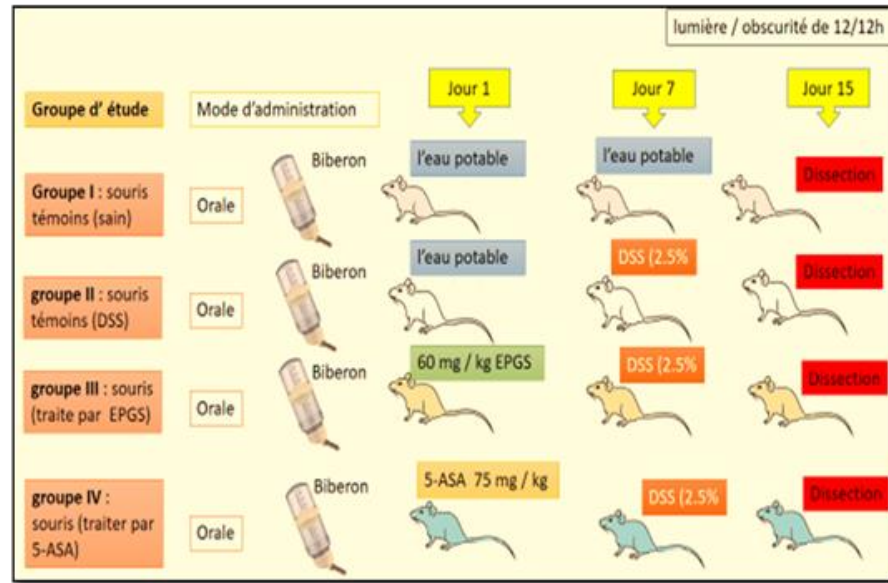


Figure 17 : Répartition des animaux en groupes conçus pour l'expérimentation.

Au cours de la période expérimentale, les souris ont été vérifiées quotidiennement pour rendre compte de l'activité de la maladie et de la sévérité de la maladie utilisant Mayo Score (ou CU-DAI: Disease Activity Index) basé sur la surveillance du poids corporel, des saignements rectaux macroscopiques et de la consistance des selles.

Tableau 4: Classification de Mayo [277].

		score
Fréquence des selles	Normale	0
	1 à 2 > nb habituel	1
	3 à 4 > nb habituel	2
	5 ou plus au nb habituel	3
Sang dans les selles	Absent	0
	< 50%	1
	> 50 %	2
	Evacuation sang pur	3
Rectosigmoidoscopie	Score endoscopique (cf infra)	0-3
Appréciation globale	Quiescente	0
	Activité légère	1
	Activité modérée	2
	Maladie sévère	3

Total score :

≤2 points (pas de sous-score >1)	Inactive
3-5 points	Activité faible
6-10 points	Activité modérée
11-12 points	Activité sévère

A partir du DAI, les pourcentages d'inhibition des différents traitements et d'extrait ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [(\text{DAI contrôle (+)} - \text{DAI prétraité}) / \text{DAI contrôle (+)}] \times 100$$

Le 15^{ème} jour les souris ont été privées de la nourriture pendant 18 heures, puis elles ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Les colons récupérés ont été excisés et perfusés avec une solution saline froide (0,9%) afin de drainer tout le sang restant dans les tissus mesurés puis pour définir la longueur de chacun. La partie distale du côlon (8 cm; 190–200 mg) a été disséquée pour les analyses plus les examinations macroscopique et microscopique. Le reste de chaque échantillon a été conservé à -80 °C dans des tubes secs pour les analyses ultérieures.

2.1.2.4. Evaluation des marqueurs du stress oxydant

❖ Préparation de la fraction cytosolique

Le tissu colique a été bien lavé avec le NaCl (0.9 %) et coupé en petits morceaux, pesés et homogénéisés (pour 1 g du colon 9 mL de solution tampon phosphate (0.1 M pH 7.4) contenant KCl 1.15 % (1 g tissu/9 mL). L'homogénat obtenu a subi une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min à 4 °C. le surnageant récupéré a été centrifugé à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4 °C. Le dernier surnageant récupéré représentant la fraction cytosolique a été utilisé pour le dosage des marqueurs du stress oxydant.

2.1.2.4.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress oxydant. La réaction de dosage repose sur la liaison en milieu acide et chaud (100 °C) entre le MDA et deux molécules de thiobarbiturique acide (TBA) donnant un pigment de couleur rose ayant une absorbance maximale à $\lambda=532$ nm. A 0.5 mL de la fraction cytosolique 10 % (KCl 1,15 M) du tissu gastrique on ajoute 0.5 mL d'acide trichloracétique (TCA) 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes. Une fois refroidi on ajoute 4 ml de *n*-butanol et on centrifuge de à 3000 tours/min durant 15 minutes. la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 535 nm. Le taux de MDA dans l'échantillon est exprimé en (nmol/mg de tissu colique en utilisant le coefficient d'extinction molaire $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1,3,3-tetraetoxypropane dans les mêmes conditions [278].

2.1.2.4.2. Dosage du superoxyde dismutase (SOD) cytosolique

L'activité enzymatique de la SOD a été estimée selon la méthode de Flohe [279]. Le principe repose sur la capacité d'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD. L'activité de l'enzyme est exprimée en U/mg de protéine du tissu hépatique (U/mg tissu). Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de (50 %) de l'autooxydation du pyrogallol. L'activité de l'enzyme est calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{Densité optique du blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

$$\text{U de SOD/ mg Pro} = \frac{\text{Inhibition totale}}{n \times 50}$$

n: mg de protéines en mg présentent dans le volume de l'échantillon utilisé.

2.1.2.4.3. Dosage de la catalase (CAT) cytosolique L'activité

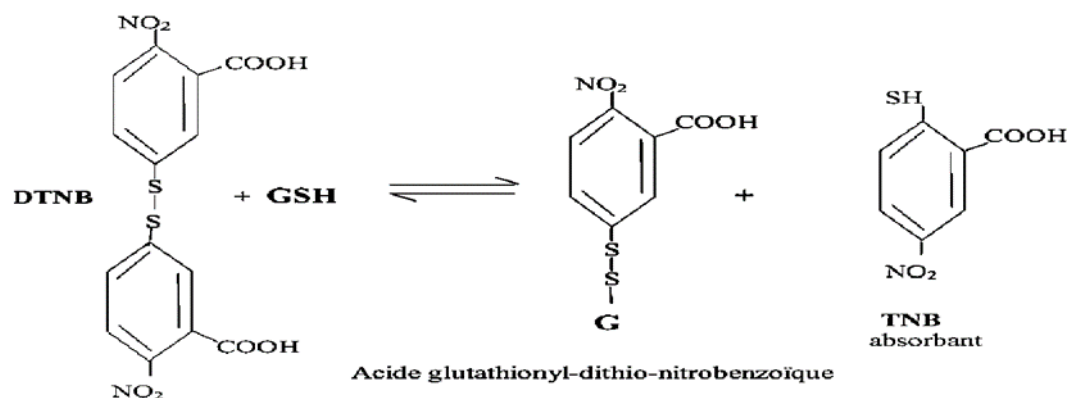
L'activité enzymatique de la CAT a été évaluée selon la méthode d'Aebi [280]. Le principe repose sur la disparition de H_2O_2 à 25 °C en présence de source enzymatique dans la fraction cytosolique selon la réaction suivante:



La quantité de H_2O_2 décomposé est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme. L'absorbance est enregistrée à une longueur d'onde de 240 nm chaque minute dans un intervalle de temps de 2 min. L'activité enzymatique est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire : $0,043 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en U/mg de protéine hépatique (U: μmol de H_2O_2 consommé par minute par mg de protéines).

2.1.2.4.4. Dosage du glutathion réduit (GSH)

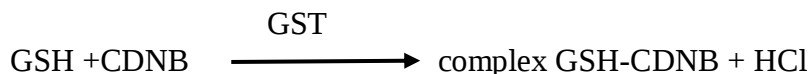
Le glutathion se trouve dans la cellule sous deux formes : une forme oxydée «GSSG» et une forme réduite « GSH » représentant plus de 99% de la quantité total. Le dosage du GSH a été réalisé selon une méthode colorimétrique utilisant le réactif d'Ellman (DTNB) [281] adaptée par Sedlak [282]. La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) qui présente, à pH alcalin (8-9), une absorbance à 412 mn selon la réaction suivante:



Les résultats sont retenus en se basant sur un coefficient d'extinction molaire de GSH 13100 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine.

2.1.2.4.5. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)

La mesure de l'activité des GSTs a été réalisée par la méthode de Habig et al. [283]. Cette méthode consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugué facilement avec le GSH sous l'action de nombreuses formes de GST. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'un complexe (GSH-CDNB) qui a une absorbance maximale à 340 nm.



La procédure consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDBN) à une température de 37 °C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm. Les résultats sont retenus en utilisant un coefficient d'extinction molaire de CDBN: $9.6.\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ et exprimés en U/mg de protéine de l'estomac (U: μmol de conjugué CDBN formé/min).

2.1.2.4.6. Dosage du glutathion peroxydase (GPx) cytosolique

L'évaluation de l'activité enzymatique de GPx est basée sur la méthode utilisée par Rotruck et al. [284]. La GPx de l'homogénat tissulaire oxyde le GSH, avec lequel simultanément le H_2O_2 se réduit en H_2O . La quantité du GSH restante réagit avec la solution DTNB pour donner un composé coloré qui est mesuré par spectrophotométrie à $\lambda=420 \text{ nm}$. L'activité de GPx est exprimées en U/mg protéine de foie (U: μmol de GSH oxydé/min).

2.1.2.4.7. Dosage de lactate déshydrogénase (LDH)

Les lactates déshydrogénases (LDH) (déshydrogénases lactiques) sont des enzymes cytoplasmiques présentes dans tous les tissus et catalysent la transformation réversible du lactate-pyruvate. L'activité LDH dans le tissu colique a été estimée selon Kornberg [285]. En présence d'une enzyme, l'acide pyruvique est transformé en acide lactique. L'acide pyruvique réagit avec la 2,4-dinitrophényl hydrazine et forme une hydrazone colorée ayant une absorbance maximale à 400-500 nm. L'activité LDH a été exprimée en tissu U/g.

Dosage des protéines

La teneur en protéines de chaque échantillon a été estimée par la méthode de Lowry et al. [286] en utilisant l'albumine sérique bovine comme standard.

2.1.3. Evaluation des Marqueurs de stress nitrosatif

2.1.3.1. Evaluation des Marqueurs de stress nitrosatif *in vitro*

2.1.3.1.1. Activité de piégeage du monoxyde d'azote (NO)

Le NO peut être engendré à partir du nitroprussiate de sodium [287]. En solution aqueuse à pH physiologique (7,2) le nitroprussiate génère spontanément de l'oxyde nitrique [288]; ce dernier interagit avec l'oxygène pour donner des ions nitrite qui peuvent être évalués à l'aide du réactif de Greiss. Les piégeurs (les antioxydants) entrent en compétition avec l'oxygène conduisant à une réduction de la production d'oxyde nitrique [287]. Brièvement, le nitroprussiate de sodium (5 mM) dissous dans 0,5 ml de solution saline tampon phosphate (pH 7,4) sont mélangés avec 0,5 ml d'extrait (de différentes concentrations) puis incubés à 25 °C pendant 120 min. 0,5 ml de la solution incubée sont mélangés avec 0,5 ml de réactif de Griess puis laissés à la température ambiante durant 30 min. L'absorbance du chromophore développé fut mesurée à 546 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical oxyde nitrique est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance à 546 nm du contrôle (solutions standard de nitrite de sodium).

A_{extrait} : Absorbance à 546 nm de l'extrait testé.

2.1.3.1.2. Évaluation de l'activité de piégeage du peroxy-nitrite (ONOO⁻)

Le ONOO⁻ a été synthétisé par la méthode décrite par Beckman et al [288]. Une solution acide (HCl 0,6 M) de 5 ml de H₂O₂ (0,7 M) a été mélangée avec 5 ml de KNO₂ 0,6 M sur un bain

de glace pendant 1 s et 5 ml de NaOH 1, 2 M glacé ont été ajoutés. L'excès de H_2O_2 a été éliminé par traitement avec du MnO_2 granulaire prélavé avec du NaOH (1,2 M) et le mélange réactionnel a été laissé pendant une nuit à $-20\text{ }^{\circ}C$. La solution de peroxyxynitrite a été collectée au sommet du mélange congelé et la concentration a été évaluée par spectrophotométrie à 302 nm.

Un essai de blanchiment au bleu Evans a été utilisé pour mesurer l'activité de piégeage du peroxyxynitrite. Le test a été réalisé par une méthode standard avec une légère modification [289]. Le mélange réactionnel contenait 50 mM de tampon phosphate (pH 7,4), 0,1 mM de DTPA, 90 mM de NaCl, 5 mM de KCl et 12,5 μM de bleu Evans, diverses concentrations de EPGS et 1 mM de peroxyxynitrite dans un volume final de 1 ml. Après incubation à $25\text{ }^{\circ}C$ pendant 30 minutes, l'absorbance a été enregistrée à 611 nm. Le pourcentage de piégeage d' $ONOO^-$ a été calculé en comparant les résultats du test et des échantillons blancs. L'acide ascorbique a été utilisé comme composé de référence.

2.1.3.2. Evaluation des Marqueurs de stress nitrosatif *in vivo*

2.1.3.2.1. Mesure de l'oxyde nitrique, S-nitrosothiol et du peroxyxynitrite

La production de NO a été évaluée en mesurant le niveau de nitrite (un indicateur de NO) dans le surnageant de la muqueuse du côlon en utilisant le réactif de Griess décrit par Cortas et Wakid [290]. La concentration du nitrite dans a été déterminée à partir d'une courbe standard de $NaNO_2$. Les résultats sont exprimés en nmol/mg de protéine.

La mesure du S-nitrosothiol a été réalisée en utilisant la méthode colorimétrique décrite par Wink et al. [291] basée sur la réaction du réactif de Griess avec les ions Hg^{2+} . L'absorbance du complexe résultant a été mesurée à 490 nm. Les résultats ont été exprimés en nmol/mg de protéine.

Le taux de peroxyxynitrite a été dosé selon la méthode décrite par Beckman et al. [288]. Le principe de la méthode repose sur l'analyse la nitration du phénol médiée par le peroxyxynitrite, entraînant la formation de nitrophénol. L'absorbance du complexe obtenu a été mesurée à une longueur d'onde de 320 nm, les résultats ont été exprimés en $\mu mol/mg$ de protéine.

2.1.4. Évaluation des marqueurs d'inflammation

2.1.4.1. Mesure de l'activité de myéloperoxydase (MPO)

La MPO colique, un marqueur des neutrophiles, a été évalué selon la méthode de Bradley et al. [292]. L'absorbance a été mesurée à 400 nm après 5, 10 et 15 minutes. L'activité MPO est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ($1.13 \times 10^4\text{ cm}^{-1}M^{-1}$) d'O-dianisidine

oxydé. Les résultats sont exprimés en U MPO /mg de tissu dont l'unité (U) de l'activité MPO est définie par la conversion de 1 μmol de H_2O_2 en eau durant 1 min à 25 °C.

2.1.4.2. Évaluation des cytokines dans le côlon

Pour la détermination des cytokines dans la muqueuse du côlon, des extraits de protéines ont été obtenus par homogénéisation de la muqueuse du côlon (0,5 mg de tissu/mL) dans un mélange de Tris HCl (50 mM), pH 7.4, dithiothréitol (0,5 mM) et 10 $\mu\text{g/mL}$ cocktail d'inhibiteurs de protéinase contenant du phénylméthylsulfonyl fluorure, pepstatine et leupeptine. Les échantillons ont été centrifugés à 10 000 x g pendant 20 minutes à 4 °C et les surnageants furent stockés à -80 °C jusqu'au dosage. Les niveaux des cytokines, de l'interleukine-6 (IL-6), du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) ont été déterminés par un ELISA sandwich spécifique en utilisant les anticorps de capture et de détection biotinylés. Les anticorps de BD Biosciences ont été utilisés conformément aux recommandations du fabricant.

2.1.5. Analyse macroscopique et microscopique de l'inflammation du côlon

2.1.5.1. Examen macroscopique

Le gros intestin a été prélevé et ouvert longitudinalement. Après avoir lavé le contenu luminal, les lésions de la muqueuse du côlon ont été évaluées macroscopiquement en utilisant l'échelle de notation de Morris et al. [293] selon la graduation suivante: score 0 (aucun dommage); score 1 (hyperémie localisée sans ulcères); score 2 (ulcères linéaires sans inflammation significative); score 3 (ulcère linéaire avec inflammation sur un site); score 4 (plus de sites d'ulcération et d'inflammation, la taille des ulcères <1 cm); score 5 (multiples inflammations et ulcères, taille des ulcères 1 cm).

2.1.5.2. Analyse microscopique et examen histologique

Les échantillons désignés pour l'histologie ont été excisés des 6-8 cm distaux du côlon, fixés dans du formol tamponné à 10 % et inclus dans des blocs de paraffine. Des tranches avec des sections de 5 μm ont été colorées avec de l'hémaréine-éosine (HE). Le scoring microscopique des coupes de muqueuse du côlon a été réalisé en utilisant cinq paramètres: l'infiltrat cellulaire, la perte des cryptes, l'infiltration cellulaire, l'œdème et / ou ulcérations, (chacun 0-6). Pour les lésions tissulaires, aucun dommage n'a été noté 0, jusqu'à 50% de perte des cryptes a été noté 1, 50-70 % de perte des cryptes avec l'épithélium intact a été noté 2 et la perte totale des cryptes avec

l'épithélium perdu a été noté comme 3. Le score histologique combiné de gravité de la colite variait de 0 à 6 chiffres [294, 295, 296].

3. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type (ET). Les données ont été analysées par ANOVA à un facteur suivi les comparaisons post hoc sont effectuées test de différence significative honnête (HSD) de Tukey. Le niveau de significativité pour comparer la signification entre les groupes est défini à $p < 0,05$ et $p < 0,01$, en utilisant Programme Open Stat 2014. Toutes les expériences *in vitro* ont été réalisées en triplet ($n=3$), pour celles *in vivo* $n = 10$.

IV - RÉSULTATS

IV Résultats

1. Rendement des extraits bruts de polysaccharides

Tableau 5: Rendement d'extraits brut des polysaccharides issus de *Gelidium spinosum* (EPGS).

Algue	Extraction	rendement
<i>Gelidium spinosum</i>	polysaccharides	4.2 %

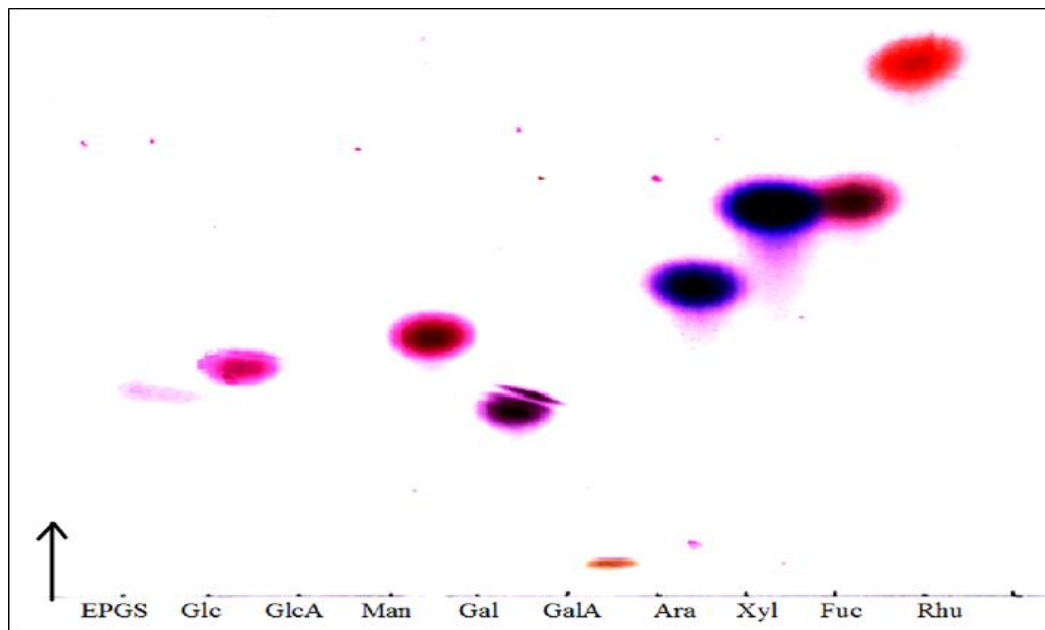


Figure 18 : CCM de l'hydrolyse d'EPGS par l'acide trifluoroacétique 4 M à 110°C.

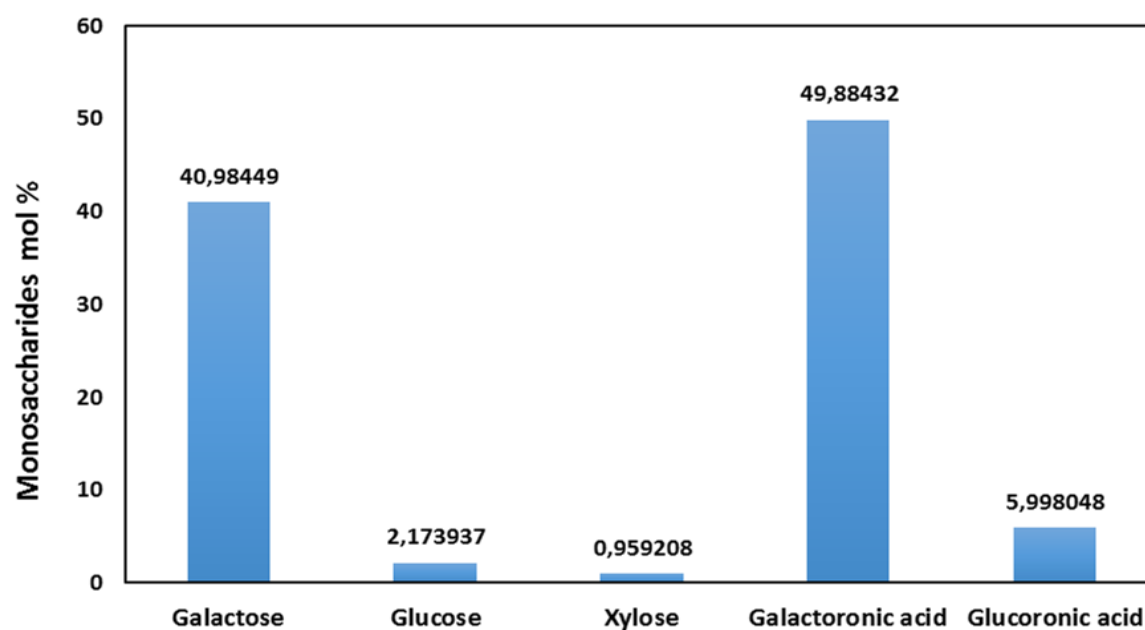


Figure 19: Composition en monosaccharide d'EPGS effectué par HPAEC-PAD.

Le rendement des polysaccharides de l'extrait algal brut de *G. spinosum* (EPGS) obtenu est de l'ordre de 4.2 % (Tableau 5). L'analyse qualitative par chromatographie CCM (Figure 18) ainsi que l'analyse quantitative par HPAEC-PAD (Figure 19) montrent que le profil de EPGS en monosaccharides est caractérisé par une dominance majoritaire du galactose (40,98 %) et de sa dérivée l'acide galacturonique (49,88%) à côté de la présence du glucose (2,17 %), et du xylose (5,99 %).

2. Evaluation de l'activité antioxydant d'extrait algal

2.1. L'activité antioxydante d'extrait algal *in-vitro*

2.1.1. L'effet scavenger du DPPH°

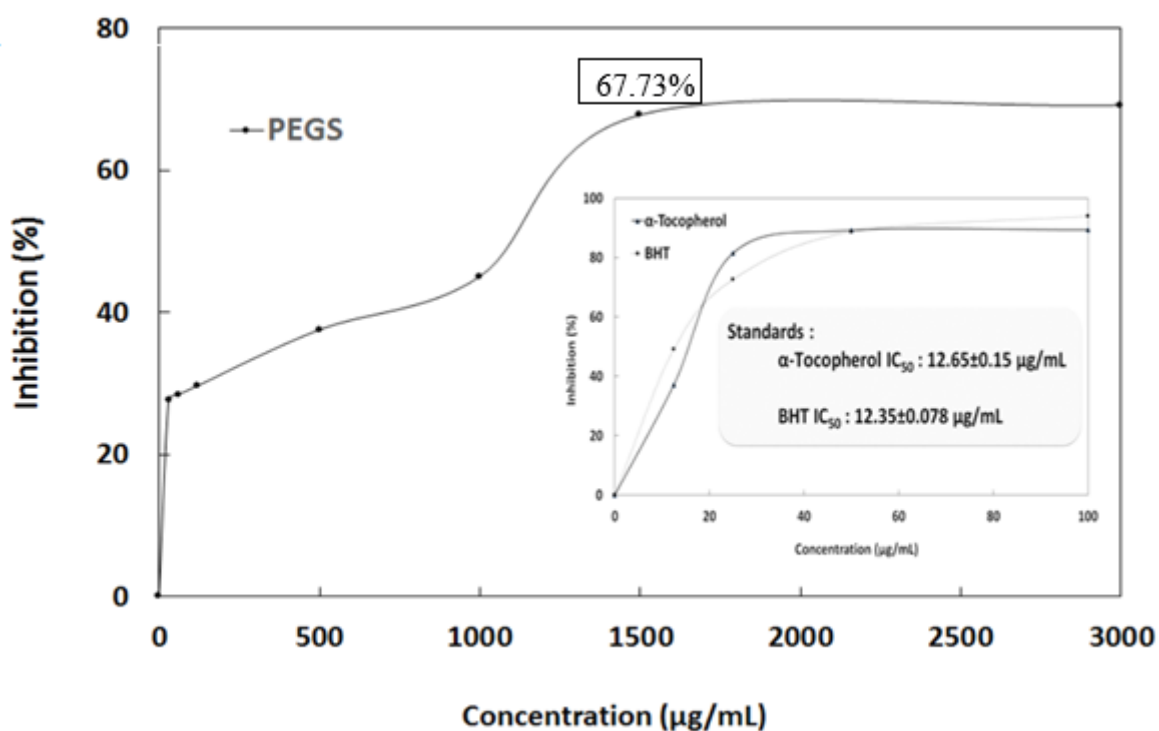


Figure 20 : Activités scavenger du radical DPPH° de EPGS et des standards. Les valeurs sont présentées en moyennes $\pm$ SD (n=3) $p < 0,01$.

L'évaluation de l'activité antioxydante via La méthode de DPPH° a reçu la plus grande attention en raison de sa rapidité, sensibilité, commodité et de sa reproductibilité. Cette méthode peut s'adapter à diverses matrices et elle est assez sensible pour détecter les substances actives à des concentrations si basses [297].

La figure (20) montre que l'activité antiradicalaire est dose-dépendante. La réduction du radical DPPH augmente significativement en fonction de l'augmentation des concentrations d'EPGS. A 1500 $\mu\text{g/mL}$ l'activité de piégeage du DPPH° par l'EPGS était de l'ordre de $67,73 \pm 0,65$ %. L'EPGS a manifesté une valeur IC_{50} de $670,35 \pm 37,43$ $\mu\text{g/mL}$, celle des standards utilisés pour la comparaison était $12,35 \pm 0,078$ $\mu\text{g/mL}$ dans le cas du BHT et $12,65 \pm 0,15$ $\mu\text{g/mL}$ dans le cas α -Tocophérol.

2.1.2. L'effet scavenger de l'ABTS^{•+}

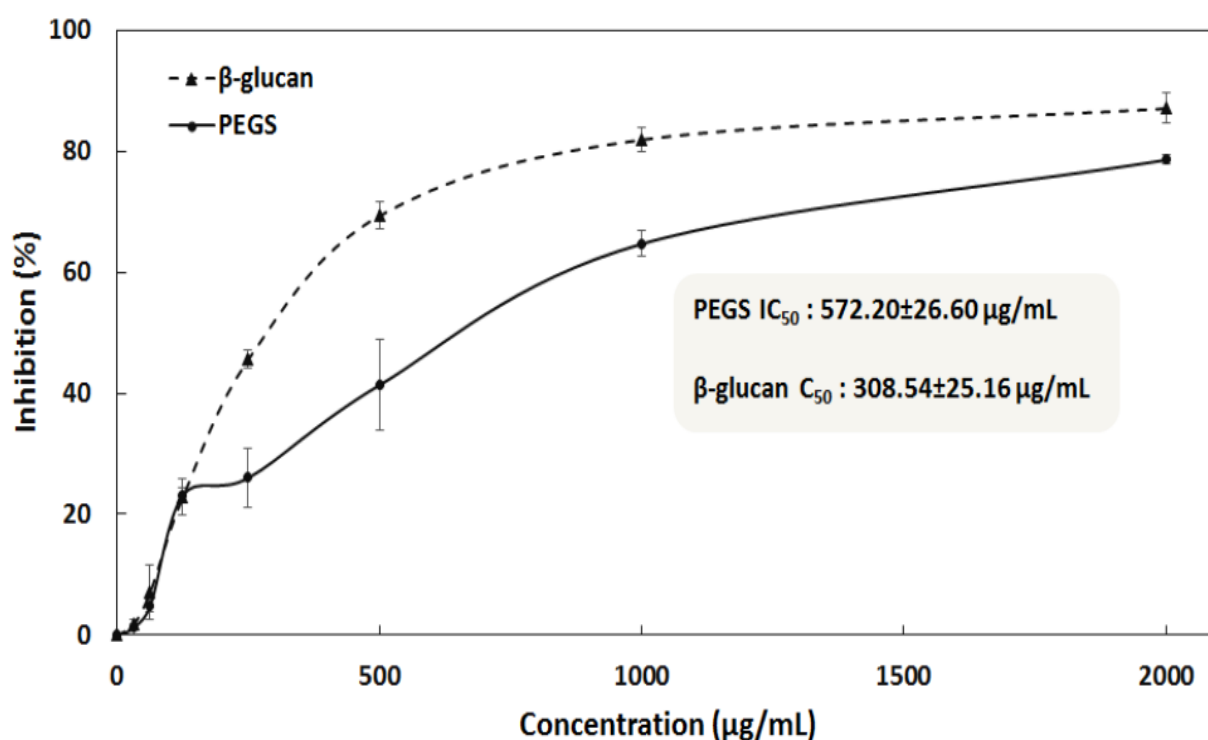


Figure 21 : Activités scavenger du radical $\text{ABTS}^{\circ+}$ d'EPGS et du standard. Les valeurs sont présentées en moyennes $\pm$ SD ($n=3$) $p<0.01$.

Selon la figure (21), l'activité de piégeage du radical $\text{ABTS}^{\circ+}$ par le EPGS s'est révélée augmenter suivant une courbe dépendant de la dose. La valeur d'inhibition maximale ($78,63 \pm 0,719$ %) a été observée à 2000 $\mu\text{g/mL}$ celle β -glucan ($69,377 \pm 2,246$ %) qui a nécessité uniquement 500 $\mu\text{g/mL}$. L'EPGS a présenté une IC_{50} à 572.20 ± 26.60 $\mu\text{g/mL}$. Le β -glucan utilisé comme standard, a donné une IC_{50} à 308.54 ± 25.16 $\mu\text{g/mL}$. L'activité antioxydante d'EPGS est due au mécanisme de transfert d'électrons. Une molécule d' $\text{ABTS}^{\circ+}$ chélate un électron (ou un atome d'hydrogène) du EPGS et régénère le substrat parent, $\text{ABTS}^{\circ+}$ [298].

2.1.3. Le pouvoir réducteur

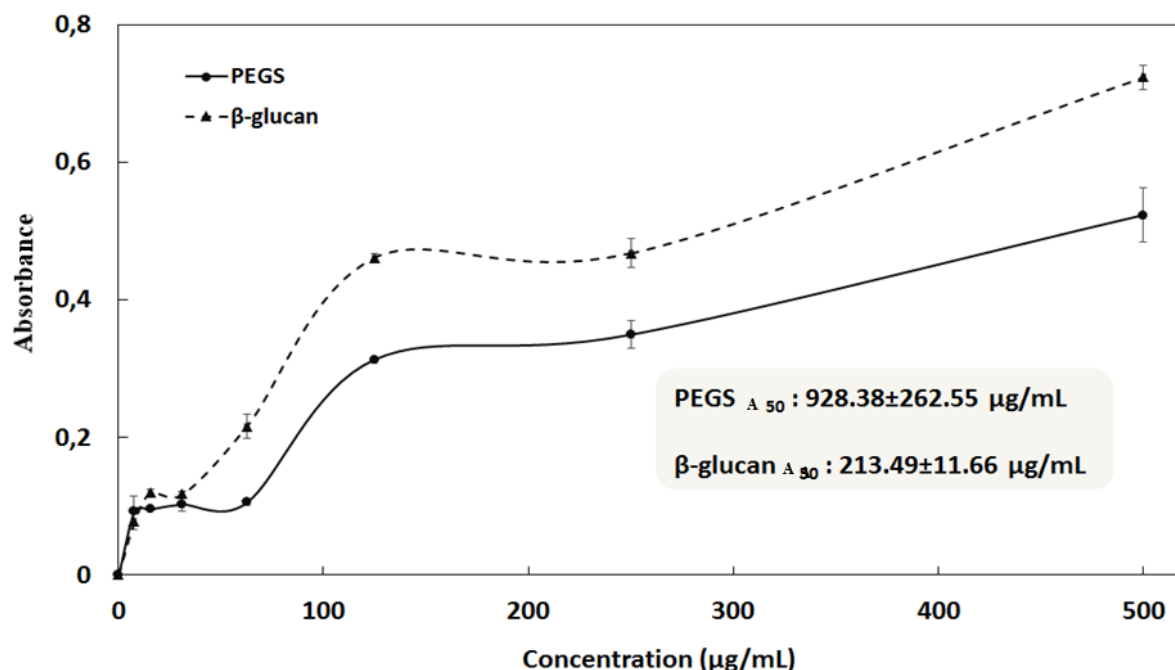


Figure 22 : Pouvoir réducteur d'EPGS et du β -glucane. Les valeurs sont présentées en moyennes $\pm$ SD (n=3) $P < 0,05$.

Les propriétés réductrices indiquent que les composés antioxydants sont donneurs d'électrons et peuvent réduire les intermédiaires oxydants du processus de peroxydation lipidique, et de cette façon les antioxydants peuvent agir comme antioxydants primaires et secondaires [299].

La figure (22) montre que le EPGS a le pouvoir de réduire l'ion ferrique du ferricyanide, ceci se manifeste par l'augmentation de l'absorbance proportionnellement à la concentration [300]. Seulement l'efficacité du le EPGS ($0,523 \pm 0,039$) reste moins forte par rapport au composé de référence β -glucan ($0,723 \pm 0,0176$) à la même concentration (500 $\mu\text{g/mL}$). L' A_{50} de EPGS est significativement différente de celle de la référence β -glucan ($213,49 \pm 11,66 \mu\text{g/mL}$).

2.2. Évaluation de l'activité antioxydant *in vivo*

2.2.1. Évaluation de la toxicité aiguë de l'EPGS

L'administration orale aiguë de EPGS chez les souris ne représente aucune dangerosité jusqu'au seuil de 2000 mg/kg, p.o. Avec une dose unique, le EPGS n'a produit aucun signe de toxicité aiguë chez les animaux traités; à savoir ni mortalité ni comportement anormal ont été

notés. La dose de 60 mg/kg d'EPGS a été choisie pour l'évaluation des activités protectrices du côlon [301].

2.2.2. Effet d'EPGS sur l'indice d'activité de la maladie (DAI) et la longueur du côlon

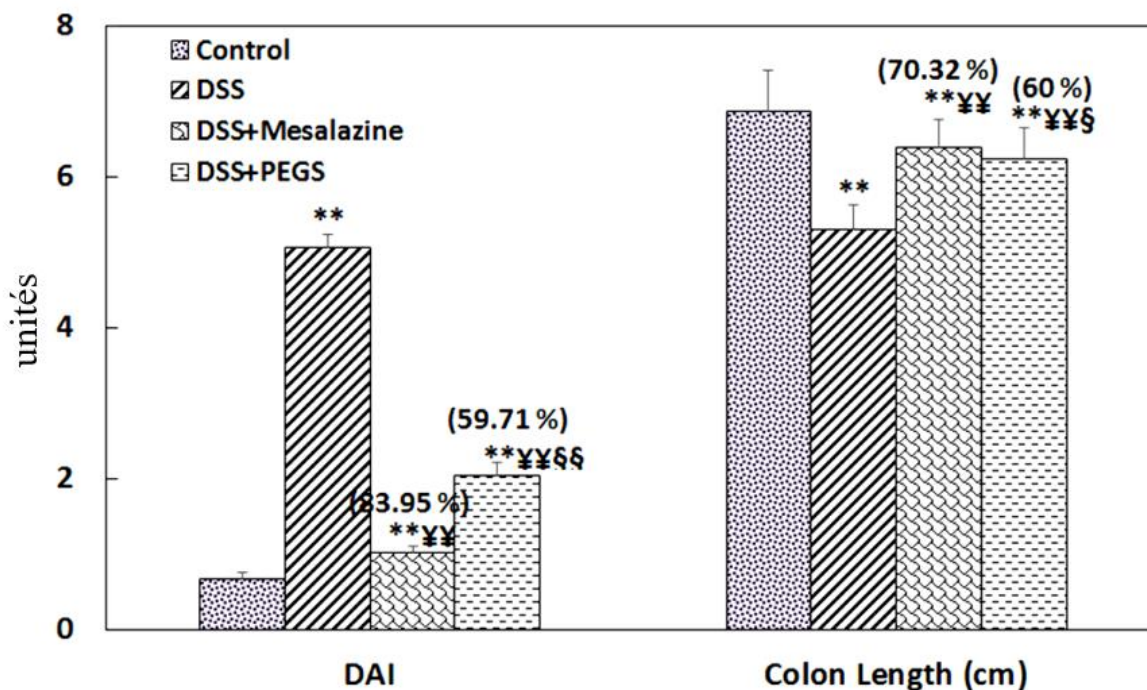


Figure 23 : L'effet d'EPGS et du mésalazine sur l'indice d'activité de la maladie (DAI) et la longueur du côlon. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD, (n = 10). (**p<0,01) : Groupe DSS vs groupes témoins ; (¥¥p<0,01) : Groupe DSS vs DSS + mésalazine ; (§§p<0,01) : Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme selon la formule : $100 \times (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs des échantillons} / (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs du contrôle}$.

La figure (23) montre qu'après 7 jours d'exposition à 2,5 % de DSS dissous dans l'eau potable, le groupe DSS a développé les symptômes cliniques d'une colite aiguë, comme le reflète le score DAI (perte de poids, diarrhée et saignement rectal) élevé et significatif ($P<0,01$) ($5,05 \pm 0,19$) par rapport au groupe témoin ($0,68 \pm 0,08$). En outre, la longueur du côlon a été trouvée significativement ($P<0,01$) plus courte dans le groupe DSS ($5,3 \pm 0,32$ cm) par rapport à celle des souris témoins ($6,85 \pm 0,56$ cm). Le prétraitement avec 60 mg/kg d'EPGS a inversé le score DAI (59,71 %) et a empêché le raccourcissement du côlon d'une manière significative (60 %) ($P<0,01$). Cet inversement atteignit chez le groupe mésalazine 83,95 % et 70,32 % respectivement.

2.2.3. Effet d'EPGS sur les marqueurs du stress oxydatif dans la muqueuse colique des souris

2.2.3.1. Effet sur le taux de malondialdéhyde (MDA) et lactate déshydrogénase (LDH)

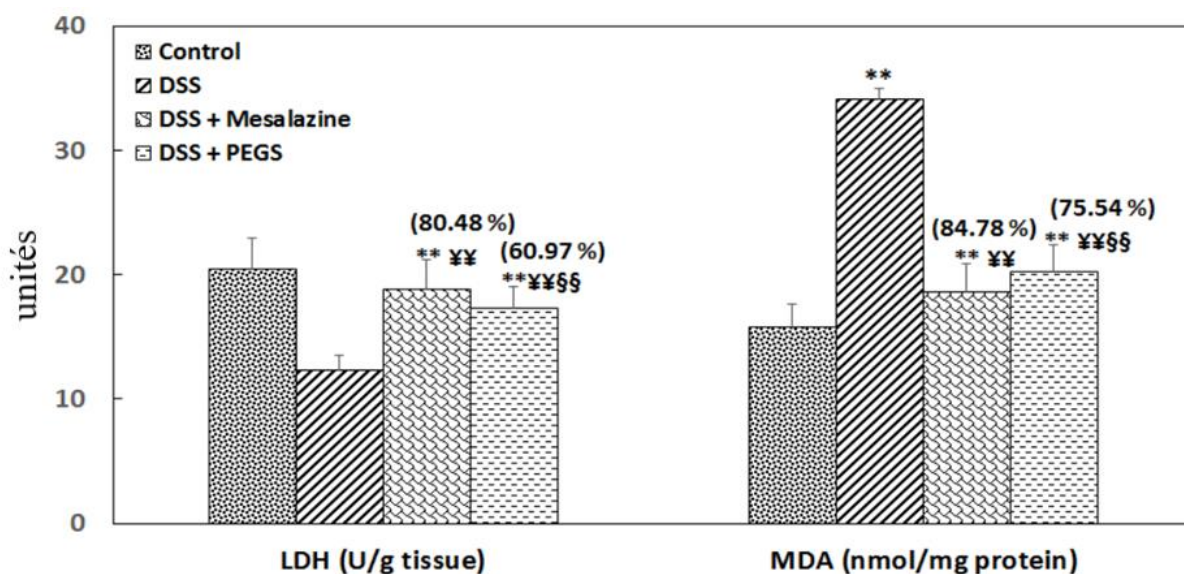


Figure 24 : L'effet d'EPGS (60 mg/Kg) sur le taux du MDA et du LDH dans le groupe DSS. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD, (n = 10). (**p<0,01) : groupe DSS- vs groupes témoins ; (¥¥p<0,01) : Groupe DSS vs DSS + mésalazine ; (§§p<0,01) : (¥¥p<0,01) : groupe DSS vs DSS + EPGS). Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit : $100 \times (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs des échantillons} / (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs du contrôle}$.

La figure (24) montre que le niveau de MDA a augmenté de manière significative ($P<0,01$) dans la muqueuse colique traitée par le DSS d'environ 2,17 fois. Cependant, l'activité du LDH a été réduite d'environ 1,62 fois, par rapport à la muqueuse colique saine. Le prétraitement des souris avec le EPGS (60 mg/kg) ou la mésalazine (75 mg/Kg) par voie orale a réduit significativement ($P<0,01$) le taux du MDA jusqu'à 75,54 % et a rétabli l'activité LDH à 60,97 %. Dans le cas du groupe traité par la mésalazine taux du MDA et celui de LDH sont rétablis à 84,78 %; 80,48 %) respectivement.

2.2.3.2. Effet sur l'activité enzymatique de CAT et SOD cytosolique

La figure (25a) montre que les souris recevant le DSS (2,5 %) ont manifesté une réduction significative ($P < 0,01$) des activités de la SOD et la CAT de la muqueuse colique en atteignant 1,75 et 2,3 fois respectivement. Le prétraitement avec le EPGS a prouvé une protection des activités enzymatique de la SOD (55,22 %) et la CAT (69,14 %) ; $P < 0,01$). Dans le cas de la mésalazine la protection la SOD et la CAT est arrivée à 82,08 % et 85,71 % respectivement ($P < 0,01$ %).

2.2.3.3. Effet sur le glutathion et les enzymes métabolisant le glutathion

Le traitement par le DSS a nettement provoqué une délétion du GSH de la muqueuse colique et a réduit les activités des enzymes y liées comme le prouve la diminution de l'activité de la GST et de celle de la GPx (Figure 25 b). Le prétraitement des souris avec de EPGS (60 mg/kg) a rétabli le taux de GSH et les enzymes du système GSH à des taux normaux. Une réponse notable (61,97 %) du GSH a été observée dans la muqueuse colique le groupe prétraitée avec le EPGS par rapport au groupe traité avec la mésalazine (82,85 %). De plus, ces résultats montrent clairement que le prétraitement avec l'extrait de EPGS a rétabli de manière significative ($P < 0,01$) les changements dans les activités des enzymes métabolisant le glutathion dans la muqueuse colique en les modifiant à 61,94 % dans le cas de la GPx et à 59,17 % dans le cas de GST. Ce rétablissement était aussi claire chez le groupe traité avec la mésalazine que ce soit pour de la GPx (72,67 %) ou la GST (79,28 %) (Figure 25 b).

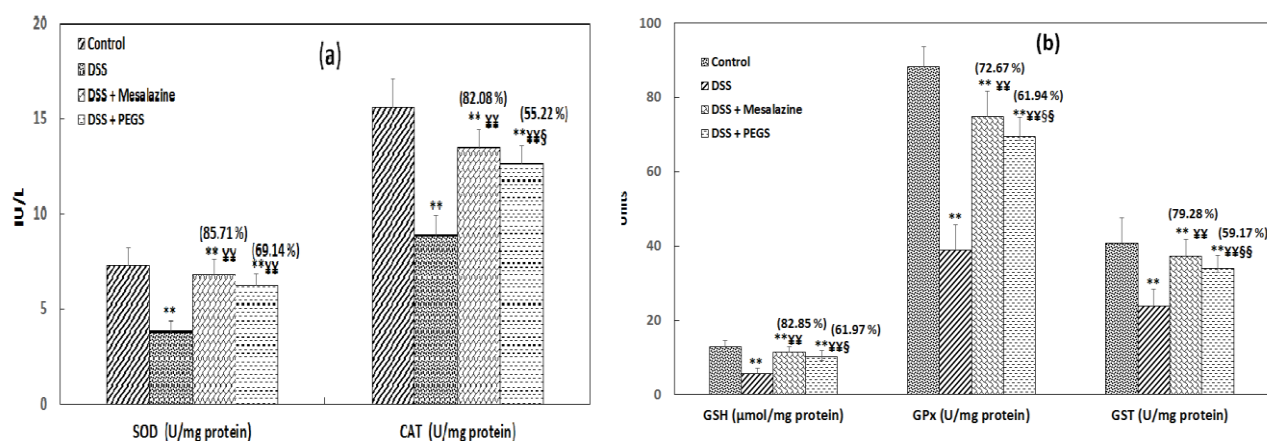


Figure 25 (a, b): L'effet de EPGS sur les marqueurs de stress oxydatif du muqueuse colique, les activités SOD et CAT (a). Glutathion et enzymes métabolisant le glutathion (b). Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD, (n = 10). (** $p < 0,01$) : Groupe DSS- vs groupes témoins ; (¥¥ $p < 0,01$) : Groupe DSS vs DSS + mésalazine ; (§§ $p < 0,01$) : (¥¥ $p < 0,01$) : groupe DSS vs DSS + EPGS). les valeurs

entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit : $100 \times (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs des échantillons} / (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs du contrôle}$.

2.3. Effet d'EPGS sur les marqueurs du stress nitrosatif

2.3.1. Effet d'EPGS sur les marqueurs du stress nitrosatif *in vitro*

2.3.1.1. Activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO)

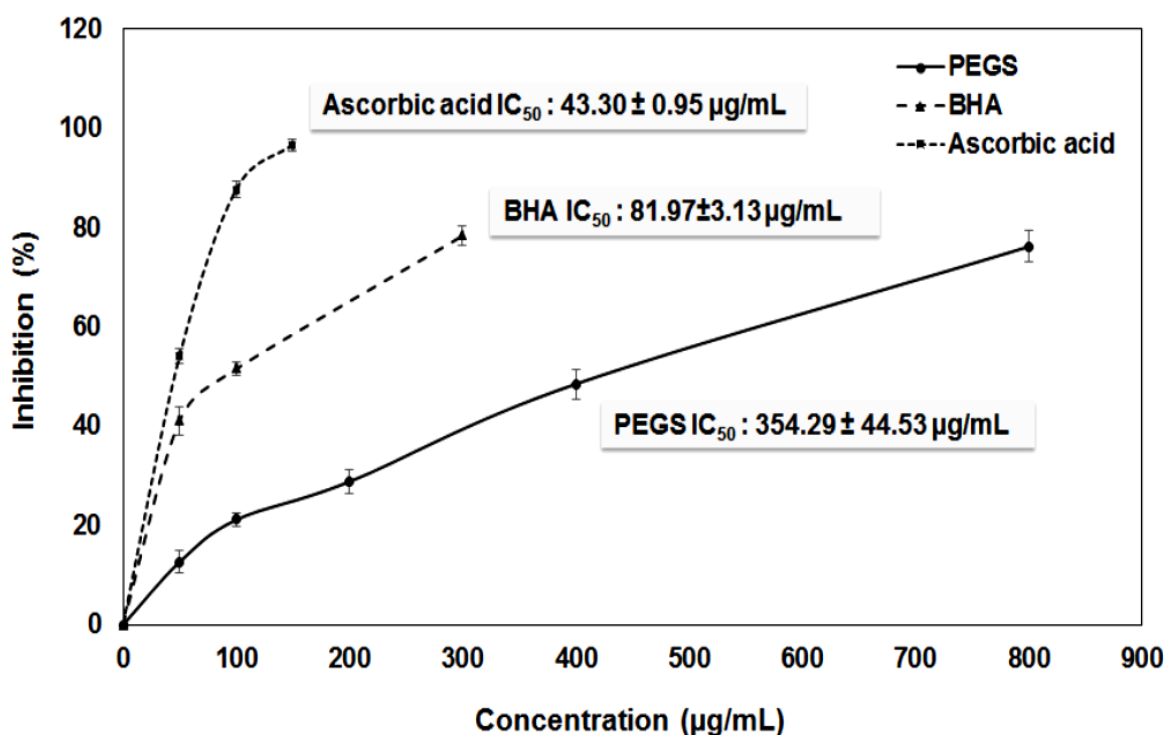


Figure 26 : Activités scavenger du NO° d'EPGS et des standards. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD (n=3) $p < 0,01$.

La figure (26) montre que l'EPGS inhibe la formation du nitrite d'une façon dépendante de la dose. L'inhibition maximale du NO° ($76,17 \pm 3,21$ %) a été observée chez le groupe traité par l'extrait à une concentration élevée (800 µg/mL) par rapport aux standards, le BHA ($78,73 \pm 1,89$ %) ou acide ascorbique ($96,50 \pm 1,32$ %), qui ont nécessité une concentration de 300 µg/mL ou 150 µg/mL respectivement. Les valeurs des IC_{50} de EP GS, du BHA et de l'acide ascorbique étaient 354.29 ± 44.53 µg/mL, 81.97 ± 3.13 µg/mL et 43.30 ± 0.95 µg/mL respectivement.

2.3.1.2. Activité de piégeage des peroxynitrites d'EPGS

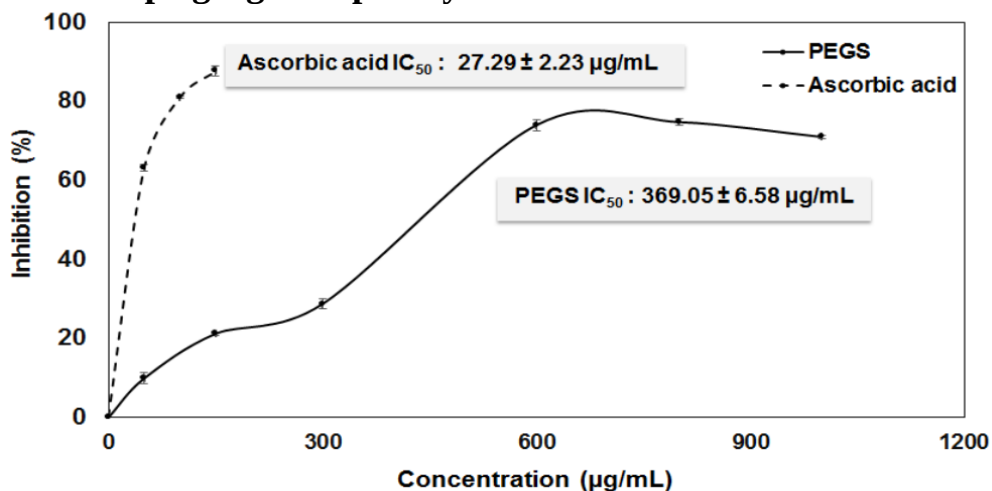


Figure 27 : Activité de piégeage de l'ONOO⁻ des EPGS et du standard. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD (n=3) $p < 0,01$.

L'activité de piégeage du peroxynitrite par le EPGS est se manifeste par une courbe dépendante de concentration. L'inhibition maximale du ONOO⁻ ($73,93 \pm 1,36$ % - $74,73 \pm 0,85$ %) a été observée à une concentration élevée allant de 600 à 800 µg/mL par comparaison à l'acide ascorbique ($81,02 \pm 0,36$ % - $87,66 \pm 1,21$ %) qui nécessita une concentration de 100 à 150 µg/mL. La IC₅₀ de EPGS a été remarqué à $369,05 \pm 6,58$ µg/mL, et celle du standard d'acide ascorbique à est ($27,29 \pm 2,23$ µg/mL) (Figure 27).

2.3.2. Effet d'EPGS sur les marqueurs de stress nitrosatif *in vivo* dans la muqueuse colique

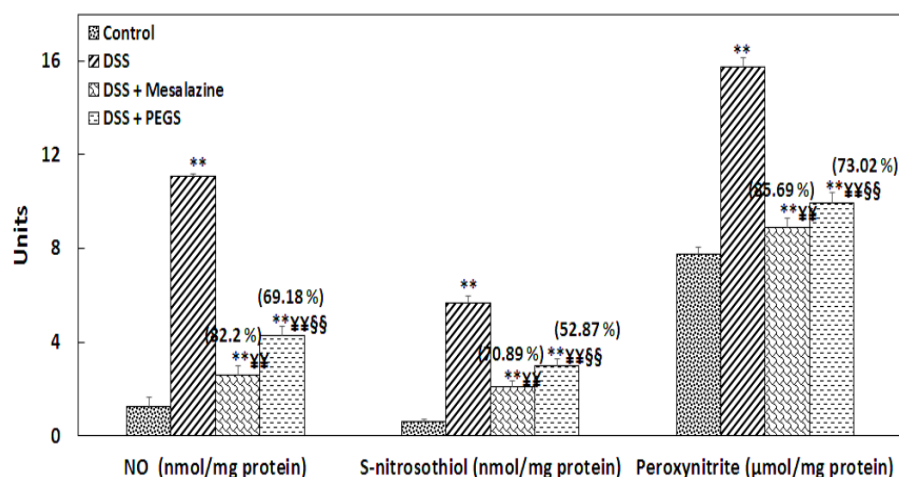


Figure 28 : Effet d'EPGS sur les marqueurs du stress nitrosatif : NO, PON et RSNO dans la muqueuse colique. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD, (n = 10). (** $p < 0,01$) : Groupe DSS vs groupes témoins ; (¥¥ $p < 0,01$) : Groupe DSS vs DSS + mésalazine ; (§§ $p < 0,01$) : Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est

calculé comme suit : $100 \times (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs des échantillons} / (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs du contrôle}$.

La figure (28) montre les taux de NO, de S-nitrosothiol et de peroxy-nitrite ont augmenté au niveau de la muqueuse colique du groupe DSS, ils sont arrivés respectivement à 8,65, 9,01 et 2,02 fois, par rapport à la muqueuse des animaux non traités. Seulement le prétraitement avec l'EPGS a normalisé ces taux respectivement à 69,18 %, 52,87 %, et 73,02 %. Dans le groupe-mésalazine ils sont rétablis respectivement à 82,2 %, 70,89 % et 85,69% (Figure 28).

2.4. Effet d'EPGS sur les marqueurs d'inflammation dans la muqueuse colique des souris

2.4.1. Activité MPO dans les tissus du côlon

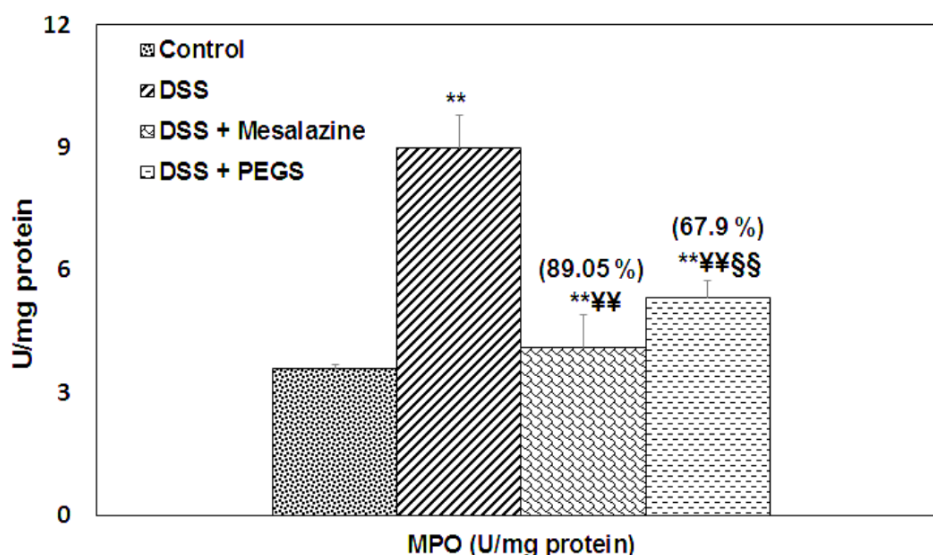


Figure 29 : Effet d'EPGS sur l'activité MPO dans les tissus coliques. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD, (n = 10), (**p<0,01) : Groupe DSS vs groupes témoins ; (¥¥p<0,01) : Groupe DSS vs DSS + mésalazine ; (§§p<0,01) : Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit : $100 \times (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs des échantillons} / (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs du contrôle}$.

La figure (29) montre une augmentation significative ($P<0,01$) de l'activité MPO dans les tissus coliques du groupe DSS ($8,99 \pm 0,3$ U/mg de protéines) qui était de l'ordre de $3,6 \pm 0,08$ U/mg dans les tissus du groupe témoin. Le prétraitement par le EPGS a prouvé une protection significative ($P<0,01$) de l'activité de la MPO (67,9 %), alors que le groupe-mésalazine manifesté une protection de 89,05%.

2.4.2. Effet d'EPGS sur les taux des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6

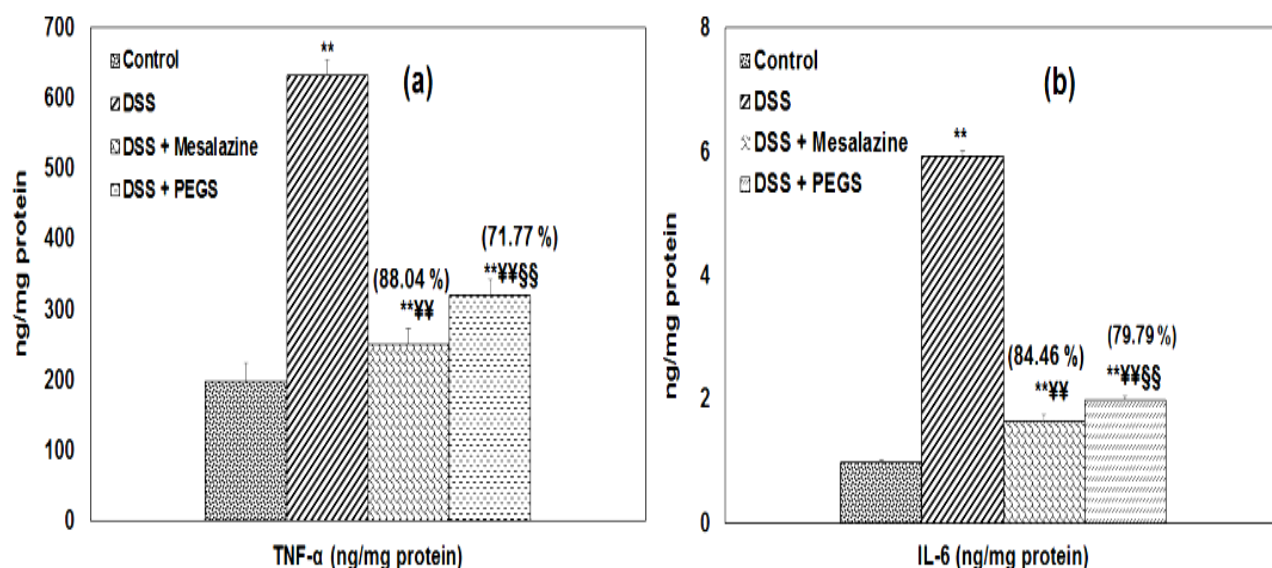


Figure 30 (a, b) : Effet d' EPGS sur les Cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse colique des souris TNF- α (a), IL-6 (b). Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD, (n = 10). (**p<0.01) : Groupe DSS vs groupes témoins ; (¥¥p<0,01) : Groupe DSS vs DSS + mésalazine. (§§p<0.01) : Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit : $100 \times (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs des échantillons} / (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs du contrôle}$.

Le traitement par le DSS a induit significativement ($P < 0,01$) la production des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon distal d'une manière significative ($P < 0,01$). Chez le groupe DSS l'augmentation du TNF- α a dépassé 3,17 fois le témoin (Figure 30 a), celle de IL-6 a atteint 6,05 fois le témoin (Figure 30 b). Le prétraitement par l'EPGS a atténué significativement ($P < 0,01$) les niveaux de TNF- α (71,77 %) et de IL-6 (79,79 %). Dans le cas du groupe mésalazine on a enregistré un rétablissement de TNF- α et d'IL-6 de 88,04 % et 84,46 % respectivement. (Figure 30 a, b).

2.5. Analyse macroscopique et microscopique

2.5.1. L'Examen macroscopique

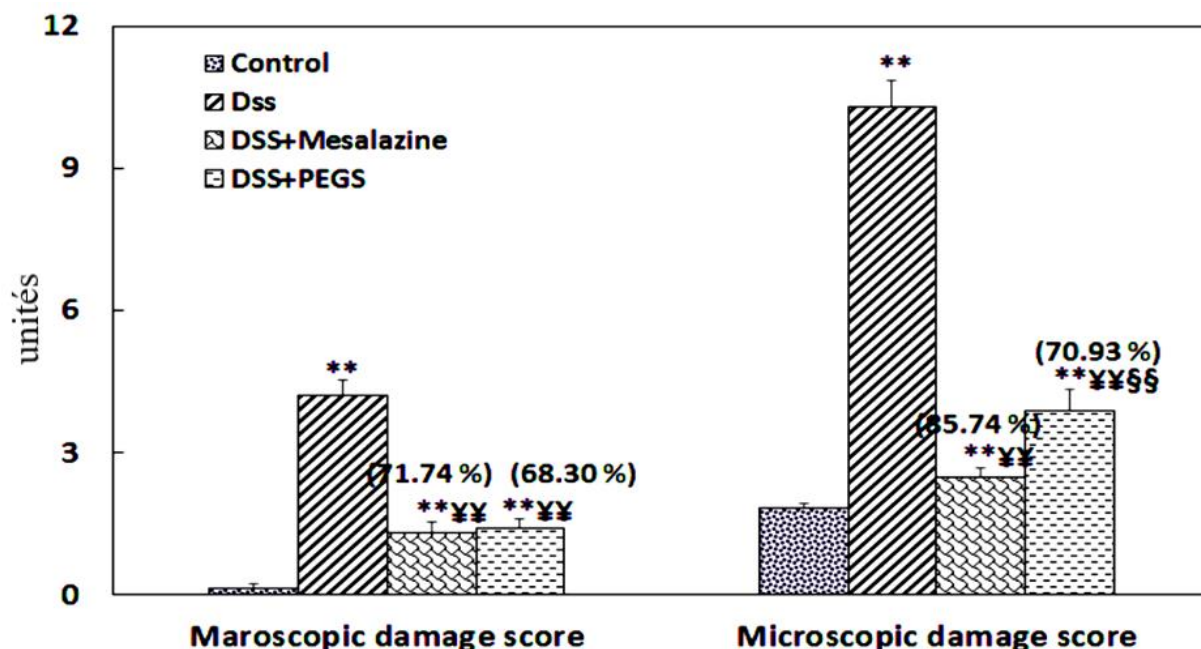


Figure 31 : Effet d'EPGS sur l'évaluation macroscopique et microscopique de la muqueuse colique. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SD, (n = 10). (**p<0.01) : Groupe DSS- vs groupes témoins ; (¥¥p<0,01) : Groupe DSS vs DSS + mésalazine ; (§§p<0,01) : (¥¥p<0,01) : groupe DSS vs DSS + EPGS). Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le % de protection est calculé comme suit : $100 \times (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs des échantillons} / (\text{valeurs du DSS}) - \text{valeurs du contrôle}$.

Selon les résultats précédents, la longueur du côlon de souris traitées par le DSS était significativement plus courte que celle des souris témoins d'environ 1,29 fois. Les données macroscopiques ont révélé également que l'inflammation, située dans le côlon distal, est manifestée par une adhésion, une hyperémie, une inflammation et une nécrose remarquable (Figure 31).

La figure (31), révèle clairement que l'administration de DSS a induit une augmentation significative ($P<0,05$) des scores macroscopiques de lésion intestinale du côlon ($4,22 \pm 0,3$) par rapport au groupe témoin ($0,15 \pm 0,08$). Le prétraitement avec l'EPGS (60 mg/kg) a réduit (68,30 %) les scores des lésions macroscopiques dans le tissu colique. L'administration de mésalazine a aussi produit des effets similaires (71,74 %) en réduisant les scores des lésions (Figure 31).

2.5.2. L'examen microscopique / histopathologique

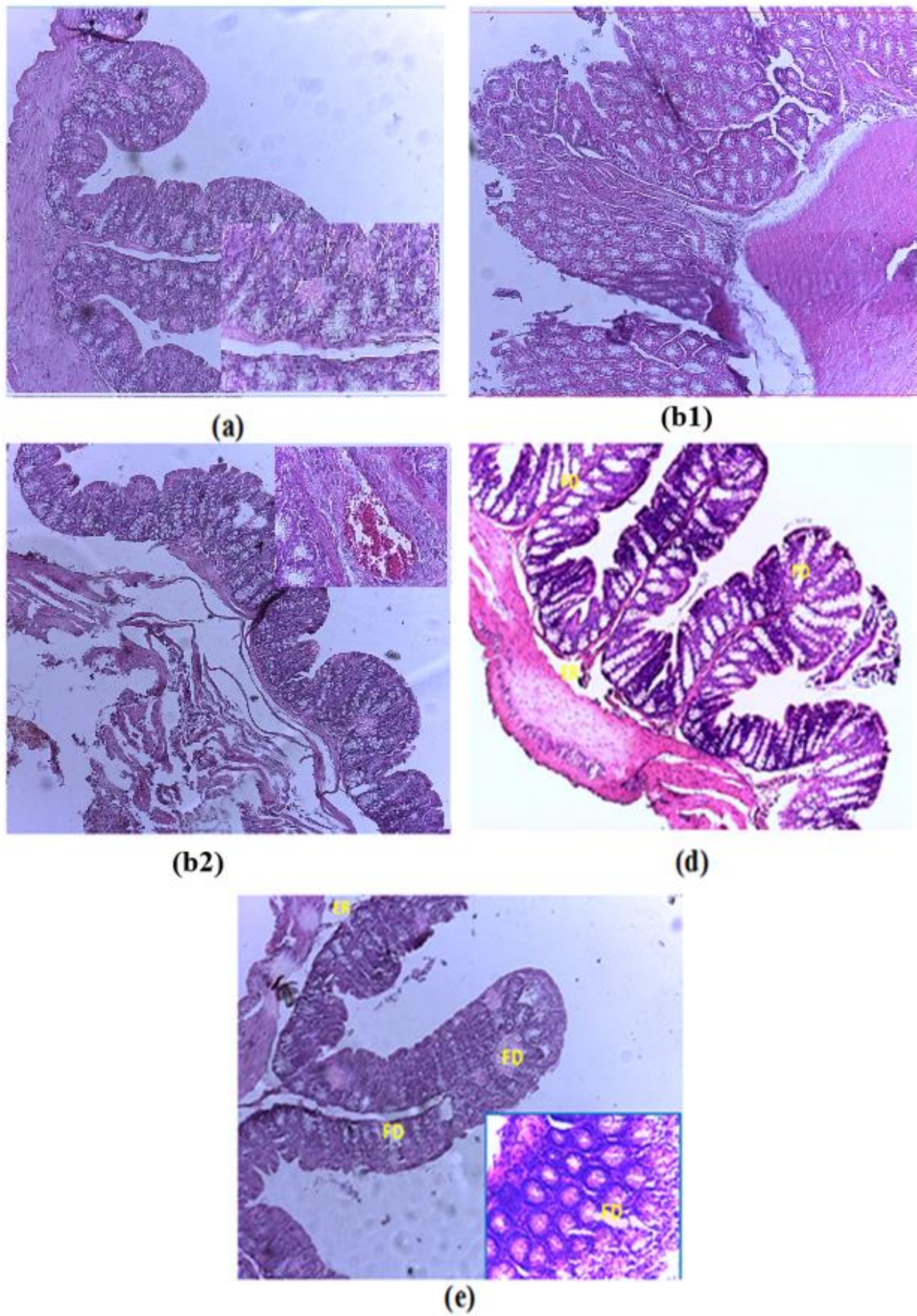


Figure 32: Micrographe de l'examen histopathologique des colons distaux (H&E.200 x, 400 x).

a : (souris témoins) : Les coupes histologiques des souris témoins ont montré une architecture normale de la muqueuse (M) et de la sous-muqueuse (SM) coliques. Les souris coliques normales ont montré une surface épithéliale intacte (EP), aucun signe d'épaississement de la muqueuse, une absence totale d'ulcérations ; la morphologie des cryptes (CP), des cellules de gobelet abondantes (GC), un petit nombre de lamina propria (LMP) ; une infiltration cellulaire a été observée chez les souris témoins. (H&E.200 x, 400 x).

b (b1, b2) : (souris DSS) : modifications histologiques multifocales dans la MS et la SM, y compris la destruction de la muqueuse, la perte significative des cryptes (LC), la raréfaction des cellules en gobelet (DGc) et la séparation des glandes, des dommages épithéliaux sévères (EPd) avec une infiltration cellulaire étendue dans la lamina propria (IFc) dans la muqueuse (MS) et la sous-muqueuse superficielle (SM) et l'expansion de la lamina propria par le liquide d'œdème (ED), l'hémorragie (HR) (H&E. 200 x,400 x).

c : (Souris DSS + mésalazine) : apparence histologique presque normale : moins de dommages histologiques, architecture du tissu colique préservée, blessures muqueuses réduites et cellule de crypte régulière, bloquant partiellement l'infiltration des cellules inflammatoires avec une perte minimale de cellules épithéliales) (H&E.200 x).

d : (souris DSS + EPGS) : diminution de l'incidence des lésions coliques : infiltration neutrophile de degré modéré et localisée dans la muqueuse, moins de cellules de crypte endommagées, léger œdème, cellules de surface épithéliales presque normales, (H&E.200 x, 400 x).

L'examen histologique de la colite induite par le DSS a montré une destruction de l'architecture colique comprenait la muqueuse et la sous-muqueuse, une réduction de la densité des glandes tubulaires et de la perte des cryptes et la déplétion des cellules en gobelets (cellules caliciformes), ainsi que l'infiltration d'un grand nombre des cellules inflammatoires dans le lamina propria. L'inflammation était principalement dans la muqueuse, dans certaines zones un œdème étendu de la sous-muqueuse a été observé, avec une augmentation marquée de l'épaisseur de la couche musculaire, une ulcération et un œdème (Figure 31, 32b).

Ces résultats histologiques ont entraîné un score élevé des dégâts microscopiques ($10,3 \pm 0,55$) par rapport au groupe témoin sain ($1,85 \pm 0,099$) (Figure 31). En revanche, le traitement avec le EPGS (70,93 %) a eu tendance à protéger le côlon des dommages en restaurant l'architecture des cryptes, en minimisant la perte de la surface épithéliale et en bloquant partiellement l'infiltration des cellules inflammatoires, ce qui a emmené à un score des dégâts microscopiques très faible par rapport aux côlons des souris traitées par le DSS (Figure 31, 32 d).

V - DISCUSSION

V. Discussion

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin se caractérisent par l'inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif due à une dérégulation du système immunitaire. Malgré l'existence de plusieurs médicaments destinée pour le traitement de ces maladies, jusqu'à aujourd'hui aucun médicament n'a pu atteindre une efficacité curative, modifier l'histoire de la maladie ou maintenir une atténuation stable au fil du temps [302].

Dans la présente étude, une inflammation aiguë du côlon, a été observée après l'administration de 2,5 % de DSS chez les souris Swiss albinos durant 7 jours. Elle est caractérisée par la présence des symptômes indésirables, similaires à ceux de la colite ulcéreuse humaine RCUH [303, 304] tels que la diarrhée sévère qui revient à l'augmentation de la perméabilité des cellules intestinales ou à l'hyperosmolarité qui est due à l'administration de DSS, un saignement rectal et une perte de poids corporel, une ulcération de la muqueuse et un raccourcissement du côlon. qui sont des indicateurs de la gravité de l'inflammation intestinale et se corrélient avec les changements pathologiques et histologiques produits au cours de la colite [305].

Différents facteurs sont impliqués dans la pathogenèse de la RCUH tels la production excessive des ERO et des RNS via le recrutement des neutrophiles qui submergent les mécanismes de protection antioxydants des tissus [306]. Le côlon est plus sensible aux dommages oxydatifs en raison de la quantité relativement faible d'antioxydants atteignable dans la muqueuse [307].

Dans la présente étude, les souris traitées par le DSS ont développé des dommages coliques qui ont été caractérisée par une augmentation substantielle aux niveaux de LDH plasmatique. L'augmentation de l'activité LDH peut être attribuée à une dystrophie de la perméabilité de la membrane cellulaire [308]. Nos résultats ont également révélé que le modèle DSS présente un stress oxydatif intense dans le tissu intestinal, ce qui est mis en évidence par le taux élevé de la peroxydation lipidique, ainsi que par la détérioration du système antioxydant enzymatique et non enzymatique concerné par l'élimination des anions superoxydes et du peroxyde, y compris la superoxydedismutase, la catalase et les enzymes dépendantes du glutathion. La réduction du système de défense antioxydant endogène peut favoriser la formation des radicaux libres, la diminution du système de défense antioxydant dépendant du GSH, et par la suite l'altération de l'équilibre redox cellulaire [309].

Nos résultats sont en accord avec ceux de Tahan [250], Spitz [251] et Brito [240] ont mentionné que les PLS de l'algue rouge *Gracilaria birdiae* diminuent les dommages de la muqueuse du côlon et réduisent la réponse inflammatoire dans le côlon, ce qui est apparemment lié à une diminution du stress oxydatif. Ont rapporté que les polysaccharides des feuilles de *Guava* améliorent le système de défense enzymatique [310]. Ont montré que les polysaccharides sulfatés

de l'algue *Gracilaria birdiae*, ont augmenté les activités enzymatiques cytosoliques (glutathion réductase et catalase) [311]. Une autre étude a montré que les polysaccharides de l'algue rouge *Gracilaria caudata* améliorent le système antioxydant et présentaient une activité antioxydante significative *in vitro* [312]. Selon Rocha de Souza [227] et Choi [313] les polysaccharides sulfatés issues des algues marines inhibent les dommages oxydatifs de l'organisme résultant des radicaux libres. Une autre étude a également montré que les dommages de la muqueuse étaient réduits par les polysaccharides sulfatés et agissent sur la production d'antioxydants endogènes [228]. En conformité avec Jaballi [314] et Rupérez [315] les polysaccharides peuvent efficacement éteindre les radicaux libres et fournissant une protection éventuelle contre les dégâts oxydatives cellulaires par un mécanisme de don d'électrons.

Dans notre investigation, l'EPGS a augmenté les niveaux des enzymes métabolisant le glutathion. Ces effets pourraient être dus à la les propriétés antioxydantes de EPGS qui renforcent l'élimination des ERO du système tissulaire du côlon. La surexpression du système antioxydant du glutathion colique chez les souris prétraitées par l'EPGS suggère que cette défense antioxydante potentielle pourrait être réactivée par l'EPGS. Plusieurs rapports ont révélés les effets du PLS sur le système glutathion [316]. Le mécanisme possible d'action antioxydant de l'EPGS comprend sa capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène et/ou augmenter les niveaux d'antioxydants endogènes. Basé sur la présente étude *in vitro*, l'EPGS est doté d'un ensemble de propriétés antioxydantes telles l'effet piégeur du DPPH°, de l'ABTS°+ et du pouvoir réducteur. Ces propriétés permettent à l'EPGS d'agir comme un agent réducteur, un donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux alkoxy et peroxydes lipidiques qui peuvent augmenter les activités des enzymes antioxydantes en modulant les enzymes clés liées au maintien du glutathion [317]. Ces résultats qui sont en accord avec ceux de Barros-Gomes [311] et de Brito [228] indiquent que les polysaccharides d'origine algale jouent un rôle important en tant que piégeurs des radicaux libres *in vitro*. Des études similaires montrent que les polysaccharides des algues rouges ont amélioré le système antioxydant et ont présenté une activité antioxydant significative *in vitro* [312, 313, 318, 319]. D'autres recherches ont montré que l'extrait riche en polysaccharides de l'algue *Eklonia kava* a montré une capacité élevée de piégeage des anions superoxydes. Les fucoïdanes (polysaccharides sulfatés) de l'algue *Laminaria japonica* et les ulvanes (polysaccharides anioniques sulfatés) de l'algue *Ulva pertusa* ont une activité de piégeage du radical superoxyde beaucoup plus forte que la vitamine C [188]. Certaines études ont investigué la corrélation entre la teneur en sulfate et l'activité antioxydante. D'après Alves [222] une teneur élevée en sulfate dans les polysaccharides est proportionnelle à une grande capacité à piéger les radicaux. Selon Wang [320] la capacité de piégeage pourrait être attribuée à la présence de groupes acétyle et benzoyle dans le polysaccharide sulfaté. Les PLS avec des polymères acétylés et sulfatés sont efficaces pour le

piégeage du radical superoxyde [318, 319]. Dans la présente étude, nous avons montré que les lésions de la muqueuse intestinale étaient accompagnées par un taux élevé de RNS. Une attention particulière doit être accordée au RNS, qui peuvent être produits et émis par les cellules immunitaires et jouent un rôle p dans la physiopathologie de la colite ulcéreuse. Le recrutement et l'activation des neutrophiles au cours d'une inflammation aiguë contribuent à la surproduction de ROS/RNS qui submergent dans les mécanismes de protection antioxydants des tissus, entraînant un stress oxydatif qui perpétue l'inflammation du côlon. Le concept de stress nitrosatif découle du fait que les interactions entre les nitrosants et les oxydants peuvent donner des produits plus toxiques que le réactif seul [321, 322], ainsi, la nitrosylation peut directement stimuler des modifications oxydatives désavantageuses.

Les résultats de la présente étude ont également révélé que le stress nitrosatif, les S-nitrosothiols (donneurs de NO), le peroxyxynitrite (oxydant formé à partir de NO et de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), ont significativement augmenté dans les tissus du côlon du groupe DSS. Une espèce hautement réactive, le peroxyxynitrite ($ONOO^-$) se forme suite à la réaction de NO° avec $O_2^{\circ-}$, et peut oxyder et nitrer le génome [323]. Le stress nitrosatif peut provoquer des réactions de nitrosylation qui induisent une modification de la structure et de la fonction des protéines, et stimulent la peroxydation lipidique [324]. Les concentrations plus élevées d'espèces oxydantes peuvent favoriser la conversion du NO en formes d'oxydes plus compliquées, telles le dioxyde d'azote et le peroxyxynitrite ($ONOO^-$), ce qui peut provoquer une modification de l'homéostasie de l'état d'oxydo-réduction [325, 326, 327].

Le prétraitement par l'EPGS neutralise significativement le stress nitrosatif induit par le DSS. On se basant sur les présentes études *in vitro*, nous pouvons affirmer que l'EPGS possède une capacité d'inhibition significative du NO et du peroxyxynitrite ce qui pourrait refléter son effet anti-inflammatoire. La migration des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) dans la muqueuse est une caractéristique pathologique de la RCUH qui est généralement observée dans la lamina propria et la couche épithéliale [96, 328].

La présente étude indique que l'administration de DSS chez les souris suisses albinos se traduit par une inflammation du côlon caractérisée par un œdème au niveau de la muqueuse, une malformation des cryptes et une infiltration des neutrophiles, et qui sont mis en évidence par l'augmentation de l'activité de la myéloperoxydase qui pourrait provoquer des lésions du tissu colique.

Les dommages de la muqueuse intestinale induits par le DSS étaient également accompagnés par une réponse inflammatoire qui est mises en évidence par les niveaux élevés de $TNF-\alpha$ et IL-6. Plusieurs études ont montré que les cellules immunitaires et les cellules de l'épithéliales intestinales sécrètent divers types de cytokines pro-inflammatoires telles que le $TNF-\alpha$, l'IL-1 β et

l'IL-6 dans la muqueuse colique des patients atteints de RCUH [329] et peuvent amplifier la cascade inflammatoire entraînant des lésions du tissu intestinal dans la RCUH induite par le DSS. Plusieurs médicaments conventionnels ont été sélectionnés comme antioxydants puissants et piègeurs d'ERO pour le traitement de la RCUH chez l'homme, tels le 5-aminosalicylate (5-ASA) et l'immunosuppresseur [330, 331]. Malheureusement, ces traitements sont accompagnés d'effets secondaires potentiellement graves, ce qui limite leur utilisation. Il a été systématiquement rapporté dans la littérature que les PLSs présentant une activité antioxydante, anti-inflammatoire comme ceux extraits d'algues marines, peuvent protéger contre la mort cellulaire grâce à leur capacité à dégrader les espèces réactives de l'oxygène excessives [331]. Par conséquent, il existe une demande impérieuse pour des stratégies thérapeutiques sûres et efficaces pour les MICI humaines. Cela pourrait être le cas pour plusieurs polysaccharides qui présentent plusieurs activités biologiques, principalement liées à leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires [332, 333]. De nombreux chercheurs ont mentionné l'activité antioxydante des polysaccharides provenant de produits naturels tels que les polysaccharides des feuilles de Maca ou des feuilles d'olivier qui avaient une bonne capacité à piéger les radicaux [334, 335]. Il est intéressant de noter que plusieurs études suggèrent que le blocage de la voie de surexpression des cytokines et la réduction de l'activité MPO peuvent être utilisés comme un indicateur de l'activité anti-inflammatoire et peuvent être utiles dans le traitement de la RCUH. De nombreux médicaments ont été signalés pour diminuer la sévérité de la maladie de la RCUH, parmi lesquels on trouve l'Adalimumab qui est un bloqueur du TNF- α utilisé avec succès pour le traitement des patients atteints des maladies inflammatoires intestinales. L'anticorps anti-TNF- α , l'infliximab, est un anticorps monoclonal de souris exerçant un effet thérapeutique efficace vis-à-vis la RCUH dans les cas cliniques [336, 337]. Les aminosalicylates restent la pierre angulaire du traitement des patients atteints de RCUH active, légère et modérée. Les corticostéroïdes restent également des médicaments populaires pour induire une rémission dans la maladie de la RCUH. La sulfasalazine, la mésalamine, les stéroïdes, et les glucocorticoïdes, agissent également pour réduire l'inflammation de la paroi intestinale. Cependant, leur effet néfaste à long terme limite leur utilisation [338, 339]. Récemment, des produits naturels tels que les flavonoïdes et les polysaccharides ont montré un grand potentiel pour l'inhibition de l'inflammation [340, 341] via la modulation de l'expression des gènes pro-inflammatoires; par exemple, l'oxyde nitrique synthase (NOS), et la génération de médiateurs pro-inflammatoires comprenant des cytokines comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 [342,343,344,345,346,347,348].

Pour ces raisons, les polysaccharides sont devenus disponibles pour le traitement de la maladie de RCUH. L'implication des mécanismes anti-inflammatoires d'EPGS a été clairement démontrée dans cette étude. Notre résultat a révélé que le traitement par l'EPGS (60 mg/kg) a

réduit l'activité de la MPO comme indice d'infiltration des cellules inflammatoires dans la colite et a modulé les réponses inflammatoires probablement en préservant les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) à des valeurs proches de la normale, ce qui suggère que l'effet protecteur d'EPGS contre les lésions coliques est également lié à la régulation des cytokines pro-inflammatoires.

La caractérisation quantitative et qualitative des polysaccharides issus des algues varient selon les espèces et le genre. Au sein d'une même espèce, le rendement dépend de la localisation géographique, des conditions climatiques, des périodes saisonnières de la récolte et des systèmes utilisés pour l'extraction. L'étude de Yu [349] effectuée sur l'algue rouge *Gloiopeltis furcata* en utilisant différentes méthodes d'identification des polysaccharides (GC, HPLC, FTIR or ^{13}C -NMR) a noté que le galactose (42.9 %) était le produit majoritaire des polysaccharides constituant à côté de la présence du xylose (8.5%). [350] ont montré que la composition monosaccharidique de l'algue rouge *Gracilaria lemaneiformis* renferme principalement le galactose avec des quantités minimales de rhamnose, d'arabinose, de fucose, de glucose, de xylose et de mannose [350]. Selon Ren [351] le galactose (45,84 %) et le glucose (35,17 %) sont les composants monosaccharidiques capitaux de *Gracilaria lemaneiformis*. Une caractérisation récente des polysaccharides menée par Yu [352] sur l'espèce *Gelidium amansii* a montré qu'ils sont composés essentiellement de galactose, glucose, fucose, arabinose et de mannose. Une autre caractérisation récente réalisée par Khongthong [353] concernant la composition des polysaccharides obtenus d'un extrait brut de *Gracilaria fisheri* via une analyse par HPLC a révélé que les concentrations des monosaccharides constituant étaient selon l'ordre suivant galactose (410.30 (mg/g), glucose (59.8 (mg/g) et le xylose (18.4 (mg/g). Dans le même sens, l'étude de Baptista effectuée sur la composition des polysaccharides de *Gelidium sesquipedale* a abouti à une conclusion stipulant que cette algue rouge pourrait être considérée comme une source de galactose [354]. Les résultats obtenus dans notre étude convergent avec les études précédentes et confirment la dominance du galactose dans la composition polysaccharidique de *Gelidium spinosum*.

VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VI-Conclusion et perspectives

La recherche des substances naturelles possédant des propriétés biologiques peut contribuer à la découverte des principes ayant des intérêts dans le domaine de l'application pharmacologique et toxicologique. Les résultats obtenus répondant à notre hypothèse de travail soulevée dans la problématique permettent de conclure que l'algue rouge *Gelidium spinosum* sélectionné agit par une foule de mécanismes impliquées dans la protection vis-à-vis le stress oxydatif /nitrosatif et l'inflammation induits par le DSS provoquant une colite ulcéraire chez les souris. L'espèce *Gelidium spinosum* a été collectée de la cote de Beni Belaid qui se trouve dans la wilaya de Jijel.

La détermination de la composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique obtenu EPGS réalisée par la combinaison de deux techniques de chromatographies (CCM et HPAEC-PAD). La détermination de la composition en monosaccharide constitutifs par CCM, montre que l'EPGS est caractérisée par une prédominance du galactose et de l'acide galacturonique, à côté de la présence de l'acide glucuronique.

Les polysaccharides de l'extrait algal sont doté d'un pouvoir antioxydant important, révélée par plusieurs tests *in vitro* (l'effet scavenger du DPPH°, l'effet scavenger de l'ABTS^{o+}, le pouvoir réducteur de EPGS et du β -glucane) qui reflètent les différents mécanismes impliqués dans ce pouvoir.

Le prétraitement des souris par l'EPGS (60 mg/kg) a permis de rétablir l'indice d'activité de la muqueuse colique (score DAI) et de contrecarrer le raccourcissement du côlon.

L'évaluation de l'activité antioxydant *in vivo* d'EPGS via les marqueurs du stress oxydatif dans la muqueuse colique des souris traitées par le DSS, a montré une diminution significative des taux du MDA et une restauration de l'activité LDH par rapport à la mésalazine. L'EPGS a également restauré les activités de la SOD et celle de CAT. Nos résultats montrent clairement que le prétraitement avec l'extrait de EPGS a rétabli d'une manière significative les troubles des activités des enzymes métabolisant le glutathion dans la muqueuse colique.

L'EPGS a prouvé une capacité de piégeage vis-à-vis le NO et les peroxy-nitrites. le prétraitement avec le EPGS a aidé au rétablissement normalisé des marqueurs du stress nitrosatif (NO, S-nitrosothiol et le peroxy-nitrite).

L'EPGS a atténué significativement les taux des cytokines pro-inflammatoires, TNF- α et IL-6 ainsi que l'activité de la MPO.

Sur le plan histologique, le prétraitement avec l'EPGS a réduit les scores des lésions macroscopiques dans le tissu colique et a permis de protéger le côlon des dommages issues en restaurant l'architecture des cryptes, en minimisant la perte de la surface épithéliale et en bloquant

partiellement l'infiltration des cellules inflammatoires, ce qui a entraîné également à un score des dégâts microscopiques très faible.

Ces propriétés manifestés par l'extrait EPGS seraient due à la richesse diversifiée de cette espèce algale en terme de polysaccharides bioactives et aux oses composant qui lui attribuent diverses mécanismes d'action qui pourraient revenir à l'effet synergétique des molécule qu'il renferme.

Il ressort de ce travail donc une contribution à la connaissance de l'espèce *Gelidium spinosum* à travers l'étude de ses activités anti-inflammatoires et de son potentiel antioxydant et il ouvre d'autres perspectives à savoir :

- La poursuite de nos investigations sur la même espèce algale qui, jusqu'à présent, n'a pas fait l'objet d'études pharmacologiques; ce qui nous permettra peut-être de purifier et identifier d'autres molécules probablement impliqué dans les multiples mécanismes d'action mentionnés dans cette étude.
- L'adoption d'une approche *in vivo* plus approfondie via différentes stratégies d'évaluation afin de déceler et de visualiser le comportement d'un composé à l'intérieur de l'organisme.
- Vu l'intérêt des résultats obtenus sur l'effet protecteur du *Gelidium spinosum*, il serait intéressant de compléter ce travail par une étude plus accentuée visant la recherche du mode d'action a l'échelle moléculaire.
- La compréhension approfondie de l'effet anti-inflammatoire de cette algue en ciblant l'interaction des molécules isolée avec les vois de signalisation de l'inflammation et la mort cellulaire induite par le DSS.
- De même, les études visant la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de cet extrait et de ses molécules seraient bénéfiques avant de concevoir des investigations plus poussées quant à leur utilisation à des fins thérapeutiques.

VII- REFERENCES

VII- Références

1. Lichtenstein, G. R., Abreu, M. T., Cohen, R., & Tremaine, W. (2006). American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 130(3), 940-987.
2. Pedersen, J., Coskun, M., Soendergaard, C., Salem, M., & Nielsen, O. H. (2014). Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(1), 64.
3. Valatas, V., Vakas, M., & Kolios, G. (2013). The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(11), G763-G785.
4. Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay- Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology*, 104(1), 15-25.
5. Taylor, K. M., & Irving, P. M. (2011). Optimization of conventional therapy in patients with IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 8(11), 646-656.
6. Sales-Campos, H., Basso, P. J., Alves, V. B. F., Fonseca, M. T. C., Bonfá, G., Nardini, V., & Cardoso, C. R.B. (2014). Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48, 96-107.
7. Reviers, B. (2002). *Biologie et phylogénie des algues*. Édition par Belin ; Paris : Supde Belin. p 352-353.
8. Cabioch, J., Floh, J. Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C. F., Meinesz, A., & Verlaque, M. (1992). 1992. Guide des algues des Mers d'Europe.
9. Gayral P. (1975). *Les algues : morphologie, reproduction, écologie*. Edition Dion.Paris. p 55-70.
10. Roland, J. C., Bouteau, F., & Bouteau, H. E. M. (2008). *Biologie végétale: Organisation des plantes à fleurs*. Dunod.
11. Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive compounds and properties of seaweeds—a review. *Open Access Library Journal*, 1(4), 1-17.
12. Pérez, R. (1997). *Ces algues qui nous entourent: Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture*. Editions Quae.
13. de Jesus Raposo, M. F., De Morais, A. M. B., & De Morais, R. M. S. C. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine drugs*, 13(5), 2967-3028.
14. Marfaing, H., & Lerat, Y. (2007). Les algues ont-elles une place en nutrition?. *Phytothérapie*, 5(1), 2-5.
15. Aragão, G. F., Nonato, D. T. T., da Ponte, E. L., Sales, J. R., Alencar, D. B., Sampaio, S. S., ... & Assreuy, A. M. S. (2016). Protective effects of ethanolic extract from the red algae *Amansia multifida* on experimental inflammation, nociception and seizure experimental models. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 38(4), 465-471.
16. Leucht, S., Cipriani, A., Spineli, L., Mavridis, D., Örey, D., Richter, F., ... & Davis, J. M. (2013). Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *The Lancet*, 382(9896), 951-962.
17. Safer, A. M., & Al-Nughamish, A. J. (1999). Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: an electron microscopical study. *Histology and histopathology*, 14(2), 391-406.
18. Belon, J. P., & Lacour, B. (2015). *Physiologie*. Elsevier Masson.
19. Ellis, H., & Mahadevan, V. (2014). Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery (Oxford)*, 32(4), 155-158.
20. Drake, R. L. (2010). *VOGL, A. Wayne. MITCHELL, Adam WM Gray's anatomie pour les étudiants*. Issy-les-Moulineaux.
21. Lorins, M. C. F. B. (2006). *Etude épidémiologique et histologique des tumeurs colorectales au Mali. A propos de 252 cas (Doctoral dissertation, Thèse de Médecine. Mali)*.
22. Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., & French, K. (1999). Équilibre ionique et osmotique. *Physiologie animale. Mécanismes et adaptation*, De Boeck Université, Bruxelles, Paris, 571-626.
23. Phillips, S. F. (1984). Functions of the large bowel: an overview. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*, 93, 1-12.
24. Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of intestinal absorption and secretion. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 30(2), 145-159.
25. Marchal-Bressenot, A. (2012). *Aspects anatomopathologiques des maladies inflammatoires chroniques intestinales chez l'homme et effet d'une carence en donneurs de méthyles sur le développement intestinal chez l'animal (Doctoral dissertation, Université de Lorraine)*.
26. De Mattos, B. R., Garcia, M. P., Nogueira, J. B., Paiatto, L. N., Albuquerque, C. G., Souza, C. L., ... & Simioni, P. U. (2015). Inflammatory bowel disease: an overview of immune mechanisms and biological treatments. *Mediators Inflamm*, 493012(1155), 2015.
27. Costa, C. A. R. A., Quaglio, A. E. V., & Di Stasi, L. C. (2018). *Pfaffia paniculata (Brazilian ginseng) extract modulates Mapk and mucin pathways in intestinal inflammation*. *Journal of ethnopharmacology*, 213, 21-25.

28. Yantiss, R. K., & Odze, R. D. (2006). Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology*, 48(2), 116-132.
29. Samaké, F. F. (2021). Etude de la pathologie colorectale à Bamako au moyen de la coloscopie (Doctoral dissertation, USTTB).
30. Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434.
31. Liu, T. C., & Stappenbeck, T. S. (2016). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11, 127-148.
32. Frei, P., Biedermann, L., & Rogler, G. (2011, October). Maladie de Crohn et colite ulcéreuse—l'essentiel pour les non-gastro-entérologues. In *Forum Médical Suisse* (Vol. 11, No. 41, pp. 718-726). EMH Media.
33. Schreiber, S., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Hampe, J., & Krawczak, M. (2005). Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 376-388.
34. Nidhi, B., Sharavana, G., Ramaprasad, T. R., & Vallikannan, B. (2015). Lutein derived fragments exhibit higher antioxidant and anti-inflammatory properties than lutein in lipopolysaccharide induced inflammation in rats. *Food & function*, 6(2), 450-460.
35. Levy, P. (2008). *Hepato-gastro-enterologie*, 2ème édition edn (Collégiale des universitaires en hepato-gastroenterologie).
36. BOUCHAHMA, K. (2019). LA PLACE DE LA CHIRURGIE DANS LE TRAITEMENT DE LA RECTOCOLITE HÉMORRAGIQUE CHEZ L'ENFANT (Doctoral dissertation).
37. Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S., & Colombel, J. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), 749-753.
38. Weill, J. P., & Weill-Bousson, M. (1993). La maladie de Crohn. In *Maladie de Crohn et rectocolite hémorragique* (pp. 41-68). Springer, Paris.
39. Hanauer, S. B. (2006). Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory bowel diseases*, 12(suppl_1), S3-S9.
40. Sands, B. E. (2007). Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *Journal of gastroenterology*, 42(1), 16-25.
41. Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-317.
42. Lewis, J. D. (2014). A review of the epidemiology of inflammatory bowel disease with a focus on diet, infections and antibiotic exposure. *Nutrition, Gut Microbiota and Immunity: Therapeutic Targets for IBD*, 79, 1-18.
43. Chapman-Kiddell, C. A., Davies, P. S., Gillen, L., & Radford-Smith, G. L. (2010). Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 16(1), 137-151.
44. Asakura, H., Suzuki, K., & Honma, T. (2007). Recent advances in basic and clinical aspects of inflammatory bowel disease: which steps in the mucosal inflammation should we block for the treatment of inflammatory bowel disease?. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(15), 2145.
45. Molodecky, N. A., & Kaplan, G. G. (2010). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & hepatology*, 6(5), 339.
46. Molodecky, N. A., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., Kaplan, G. G., & Alberta Inflammatory Bowel Disease Consortium. (2011). Challenges associated with identifying the environmental determinants of the inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 17(8), 1792-1799.
47. Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., & Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1785-1794.
48. Molodecky, N. A., Soon, S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., ... & Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54.
49. Blanchard, J. F., Bernstein, C. N., Wajda, A., & Rawsthorne, P. (2001). Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *American journal of epidemiology*, 154(4), 328-335.
50. Kappelman, M. D., Rifas-Shiman, S. L., Kleinman, K., Ollendorf, D., Bousvaros, A., Grand, R. J., & Finkelstein, J. A. (2007). The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(12), 1424-1429.
51. Bernstein, C. N., Wajda, A., Svenson, L. W., MacKenzie, A., Koehoorn, M., Jackson, M., ... & Blanchard, J. F. (2006). The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Official journal of the American College of Gastroenterology* ACG, 101(7), 1559-1568.
52. Loftus, C. G., Loftus Jr, E. V., Harmsen, S. W., Zinsmeister, A. R., Tremaine, W. J., Melton III, J. L., & Sandborn, W. J. (2007). Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940–2000. *Inflammatory bowel diseases*, 13(3), 254-261.
53. Gismera, C. S., & Aladrén, B. S. (2008). Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing?. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(36), 5491.

54. Hammada, T., Lemdaoui, M. C., Boutra, F., Zoughailech, D., & Asselah, H. (2011). Aspects épidémiologiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans une population algérienne. *Journal Africain d'Hépatogastroentérologie*, 5(4), 293-302.
55. Garud, S., & Peppercom, M. A. (2009). Ulcerative colitis: current treatment strategies and future prospects. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 2(2), 99-108.
56. Furfaro, F., Bezzio, C., Ardizzone, S., Massari, A., de Franchis, R., & Maconi, G. (2015). Overview of biological therapy in ulcerative colitis: current and future directions. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*, 24(2).
57. Molodecky, N. A., Soon, S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., ... & Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54.
58. Tremblay, A. C. (2004). Étude généalogique d'individus atteints de maladies inflammatoires chroniques non-spécifiques de l'intestin. Université du Québec à Chicoutimi.
59. Lee, J. I., Park, H. J., Lee, J. Y., & Cho, B. K. (2010). A case of pyoderma gangrenosum with ulcerative colitis treated with mesalazine. *Annals of dermatology*, 22(4), 422-425.
60. Feuerstein, J. D., & Cheifetz, A. S. (2014, November). Ulcerative colitis: epidemiology, diagnosis, and management. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 89, No. 11, pp. 1553-1563). Elsevier.
61. Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., ... & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778.
62. Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., & Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1785-1794.
63. Buisson, A., Bommelaer, G., & Peyrin-Biroulet, L. (2012). Rectocolite hémorragique: épidémiologie, physiopathologie, diagnostic, histoire naturelle et stratégie thérapeutique. *EMC-Gastro-Entérologie*, 7(4), 1-19.
64. Neuman, M. G., & Nanau, R. M. (2012). Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Translational Research*, 160(1), 29-44.
65. Sartor, R. B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*, 3(7), 390-407.
66. Lukas, M., Bortlik, M., & Maratka, Z. (2006). What is the origin of ulcerative colitis? Still more questions than answers. *Postgraduate medical journal*, 82(972), 620-625.
67. Orholm, M., Binder, V., Sørensen, T. I. A., Rasmussen, L. P., & Kyvik, K. O. (2000). Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins: results of a nationwide study. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 35(10), 1075-1081.
68. Vaishnav, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., & Hooper, L. V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20858-20863.
69. Sandra, F., & Ketherin, K. (2018). Caffeic acid inhibits RANKL and TNF- α -induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in RAW-D cells. *The Indonesian Biomedical Journal*, 10(2), 140-3.
70. Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., Belluzzi, A., & Roda, E. (2010). Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 16(34), 4264-71.
71. Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., ... & Schulzke, J. D. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129(2), 550-564.
72. Gibson, P. R. (1993). Anomalies cellulaires de l'épithélium au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. *MS. Médecine sciences*, 9(8-9), 860-867.
73. Nagib, M. M., Tadros, M. G., ElSayed, M. I., & Khalifa, A. E. (2013). Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of olmesartan medoxomil ameliorate experimental colitis in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 271(1), 106-113.
74. Ordás, I., Mould, D. R., Feagan, B. G., & Sandborn, W. J. (2012). Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 91(4), 635-646.
75. Frank, D. N., Robertson, C. E., Hamm, C. M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., ... & Li, E. (2011). Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 17(1), 179-184.
76. Klotz, C., Barret, M., Dhooze, M., Oudjit, A., Chaussade, S., Coriat, R., & Abitbol, V. (2015). Rectocolite hémorragique: conduite diagnostique et prise en charge thérapeutique. *La Presse Médicale*, 44(2), 144-149.
77. Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., ... & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2), 205-211.
78. Pizarro, T. T., & Cominelli, F. (2007). Cytokine therapy for Crohn's disease: advances in translational research. *Annu. Rev. Med.*, 58, 433-444.

79. Kroft, S. H., Stryker, S. J., & Rao, M. S. (1994). Appendiceal involvement as a skip lesion in ulcerative colitis. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 7(9), 912-914.
80. Scott, D. A., Kraft, M. L., Carmi, R., Ramesh, A., Elbedour, K., Yairi, Y., ... & Sheffield, V. C. (1998). Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Human mutation*, 11(5), 387-394.
81. Müller, S., Lory, J., Corazza, N., Griffiths, G. M., Z'graggen, K., Mazzucchelli, L., ... & Mueller, C. (1998). Activated CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *The American journal of pathology*, 152(1), 261.
82. Simpson, S. J., Mizoguchi, E., Allen, D., Bhan, A. K., & Terhorst, C. (1995). Evidence that CD4⁺, but not CD8⁺ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *European journal of immunology*, 25(9), 2618-2625.
83. Bhan, A. K., Mizoguchi, E., Smith, R. N., & Mizoguchi, A. (1999). Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunological reviews*, 169(1), 195-207.
84. Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, 115(1), 182-205.
85. Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Takabayashi, K., Hayashi, T., Leider-Trejo, L., Lee, J., ... & Raz, E. (2002). Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*, 122(5), 1428-1441.
86. Joseph, S. V., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2016). Fruit polyphenols: A review of anti-inflammatory effects in humans. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(3), 419-444.
87. Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18(3), 385-405.
88. Outlioua, A. (2021). Exploration des cytokines pro-inflammatoires et de l'inflammasome NLRP3 dans les infections intracellulaires: cas de *H. pylori* et des virus à ARN (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay; Université Hassan II (Casablanca, Maroc). Faculté des Sciences).
89. Boussenna, A. (2015). Effets protecteurs d'extraits de marc de raisin riches en polyphénols dans un modèle d'inflammation colique chez le rat (Doctoral dissertation, Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I).
90. Fournier, B. M., & Parkos, C. A. (2012). The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal immunology*, 5(4), 354-366.
91. Briber, N., & Amira, W. E. (2020). Activité antioxydante et antibactérienne de la plante *Allium cepa* (Doctoral dissertation, Université de jijel).
92. Denson, L. A. (2015). Epithelial reactive oxygen species and risk for very early onset inflammatory bowel disease. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 1(5), 456-457.
93. Prabhu, V., & Guruvayoorappan, C. (2014). 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. *International immunopharmacology*, 18(1), 124-134.
94. Lih-Brody, L., Powell, S. R., Collier, K. P., Reddy, G. M., Cerchia, R., Kahn, E., ... & Mullin, G. E. (1996). Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, 41(10), 2078-2086.
95. Sampson, A. P. (2000). The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 30, 22-27.
96. Wéra, O., Lancellotti, P., & Oury, C. (2016). The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *Journal of clinical medicine*, 5(12), 118.
97. Bennike, T. B., Carlsen, T. G., Ellingsen, T., Bonderup, O. K., Glerup, H., Bøgsted, M., ... & Andersen, V. (2015). Neutrophil extracellular traps in ulcerative colitis: a proteome analysis of intestinal biopsies. *Inflammatory bowel diseases*, 21(9), 2052-2067.
98. Kannan, N., & Guruvayoorappan, C. (2013). Protective effect of *Bauhinia tomentosa* on acetic acid induced ulcerative colitis by regulating antioxidant and inflammatory mediators. *International immunopharmacology*, 16(1), 57-66.
99. Malle, E., Furtmüller, P. G., Sattler, W., & Obinger, C. (2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development?. *British journal of pharmacology*, 152(6), 838-854.
100. Schindhelm, R. K., van der Zwan, L. P., Teerlink, T., & Scheffer, P. G. (2009). Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification?. *Clinical chemistry*, 55(8), 1462-1470.
101. Andersen, V., Christensen, J., Ernst, A., Jacobsen, B. A., Tjønneland, A., Krarup, H. B., & Vogel, U. (2011). Polymorphisms in NF- κ B, PXR, LXR, PPAR γ and risk of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(2), 197.
102. Bourgonje, A. R., Feelsch, M., Faber, K. N., Pasch, A., Dijkstra, G., & van Goor, H. (2020). Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease. *Trends in Molecular Medicine*.
103. Isik, F., Akbay, T. T., Yarat, A., Genc, Z., Pisiriciler, R., Caliskan-Ak, E., ... & Sener, G. (2011). Protective effects of black cumin (*Nigella sativa*) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*, 56(3), 721-730.

104. Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., & Wallace, J. L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96(2), 795-803.
105. Boirivant, M., Fuss, I. J., Chu, A., & Strober, W. (1998). Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *The Journal of experimental medicine*, 188(10), 1929-1939.
106. Ihekweazu, F. D., Engevik, M. A., Ruan, W., Shi, Z., Fultz, R., Engevik, K. A., ... & Versalovic, J. (2021). *Bacteroides ovatus* Promotes IL-22 Production and Reduces Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Driven Colonic Inflammation. *The American Journal of Pathology*, 191(4), 704-719.
107. Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stüber, E., & Strober, W. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *Journal of experimental medicine*, 182(5), 1281-1290.
108. Noviello, D., Mager, R., Roda, G., Borroni, R. G., Fiorino, G., & Vetrano, S. (2021). The IL23-IL17 Immune Axis in the Treatment of Ulcerative Colitis: Successes, Defeats, and Ongoing Challenges. *Frontiers in Immunology*, 12, 1735.
109. Jurjus, A. R., Khoury, N. N., & Reimund, J. M. (2004). Animal models of inflammatory bowel disease. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 50(2), 81-92.
110. Nair, D. V., Paudel, D., Cantorna, M., & Singh, V. (2021). DIETARY FIBER GUAR GUM EXACERBATES COLONIC INFLAMMATION IN MULTIPLE EXPERIMENTAL MODELS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. *Inflammatory Bowel Diseases*, 27(Supplement_1), S2-S3.
111. Dharmani, P., Leung, P., & Chadee, K. (2011). Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PloS one*, 6(9), e25058.
112. Andújar, I., Ríos, J. L., Giner, R. M., Miguel Cerdá, J., & Recio, M. D. C. (2012). Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
113. Ullah, H. A., Saba, E., Lee, Y. Y., Hong, S. B., Hyun, S. H., Kwak, Y. S., ... & Rhee, M. H. (2021). Restorative effects of Rg3-enriched Korean red ginseng and *Persicaria tinctoria* extract on oxazolone-induced ulcerative colitis in mice. *Journal of Ginseng Research*.
114. Engel, M. A., Khalil, M., Siklosi, N., Mueller-Tribbensee, S. M., Neuhuber, W. L., Neurath, M. F., ... & Reeh, P. W. (2012). Opposite effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in oxazolone colitis. *Digestive and Liver Disease*, 44(1), 24-29.
115. Sasaki, S., Hirata, I., Maemura, K., Hamamoto, N., Murano, M., Toshina, K., & Katsu, K. (2000). Prostaglandin E2 inhibits lesion formation in dextran sodium sulphate-induced colitis in rats and reduces the levels of mucosal inflammatory cytokines. *Scandinavian journal of immunology*, 51(1), 23-28.
116. Wu, X., Zheng, Y., Ma, J., Yin, J., & Chen, S. (2020). The effects of dietary glycine on the acetic acid-induced mouse model of colitis. *Mediators of inflammation*, 2020.
117. Hartmann, R. M., Martins, M. I. M., Tieppo, J., Fillmann, H. S., & Marroni, N. P. (2012). Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. *Digestive diseases and sciences*, 57(8), 2038-2044.
118. Nakhai, L. A., Mohammadirad, A., Yasa, N., Minaie, B., Nikfar, S., Ghazanfari, G., ... & Abdollahi, M. (2007). Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(1), 43-50.
119. Gonzalez, R., Rodriguez, S., Romay, C., GONZÁLEZ, A., ARMESTO, J., REMIREZ, D., & MERINO, N. (1999). Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacological research*, 39(1), 55-59.
120. Tonnel, A. B., Rataczak, C., & Amniai, L. (2005). Cellules dendritiques et Toll-like récepteurs dans les maladies allergiques. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 45(3), 208-213.
121. Kaplan, A. P., Kay, A. B., & Austen, K. F. (1972). A prealbumin activator of prekallikrein: III. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein. *The Journal of experimental medicine*, 135(1), 81-97.
122. Stadnicki, A., Cadena, R. A. D., Sartor, R. B., Bender, D., Kettner, C. A., Rath, H. C., ... & Colman, R. W. (1996). Selective plasma kallikrein inhibitor attenuates acute intestinal inflammation in Lewis rat. *Digestive diseases and sciences*, 41(5), 912-920.
123. Zappa, M. (2017). Intérêt de l'IRM pour l'évaluation de la fibrose intestinale dans un modèle murin de colite radio-induite (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis, Physiologie et physiopathologie Sorbonne Paris Cité 2017. <http://www.theses.fr/2017USPCC248/document>).
124. Arnal, M. É., & Lallès, J. P. (2016). Protéines du choc thermique inductibles dans l'épithélium intestinal: propriétés protectrices et modulation par le microbiote et des facteurs alimentaires. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 51(4), 186-194.
125. Pricolo, V. E., Madhere, S. M., Finkelstein, S. D., & Reichner, J. S. (1996). Effects of lambda-carrageenan induced experimental enterocolitis on splenocyte function and nitric oxide production. *Journal of surgical research*, 66(1), 6-11.
126. Moyana, T. N., & Lalonde, J. M. (1990). Carrageenan-induced intestinal injury in the rat--a model for inflammatory bowel disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 20(6), 420-426.

127. Marcus, R., & Watt, J. (1971). Colonic ulceration in young rats fed degraded carrageenan. *The Lancet*, 298(7727), 765-766.
128. Watt, J., & Marcus, R. (1973). Experimental ulcerative disease of the colon in animals. *Gut*, 14(6), 506.
129. Faucheron, J. L., & Parc, R. (1996). Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced colitis. *International journal of colorectal disease*, 11(2), 99-101.
130. Klein, A., & Eliakim, R. (2010). Non steroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease. *Pharmaceuticals*, 3(4), 1084-1092.
131. Weill, B., & Batteux, F. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur.
132. Dignass, A., Eliakim, R., Magro, F., Maaser, C., Chowers, Y., Geboes, K., ... & Van Assche, G. (2012). Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 6(10), 965-990.
133. Maggiori, L., Bretagnol, F., Ferron, M., Bouhnik, Y., & Panis, Y. (2012). Chirurgie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *EMC-Gastro-Entérologie*, 7(2), 1-13.
134. Timmer, A., Patton, P. H., Chande, N., McDonald, J. W., & MacDonald, J. K. (2016). Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane database of systematic reviews*, (5).
135. Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M. K., & Öhman, L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 53(4), 379-389.
136. Peyrin-Biroulet, L., Khosrotehrani, K., Carrat, F., Bouvier, A. M., Chevaux, J. B., Simon, T., ... & Cesame Study Group. (2011). Increased risk for nonmelanoma skin cancers in patients who receive thiopurines for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 141(5), 1621-1628.
137. Faubion Jr, W. A., Loftus Jr, E. V., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., & Sandborn, W. J. (2001). The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*, 121(2), 255-260.
138. Pijls, P. A., & Gilissen, L. P. (2016). Vedolizumab is an effective alternative in inflammatory bowel disease patients with anti-TNF-alpha therapy-induced dermatological side effects. *Digestive and Liver Disease*, 48(11), 1391-1393.
139. Terrier, B., Beaugerie, L., Seksik, P., Sokol, H., & Kirchgesner, J. (2019). Risque de vascularite associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin: évidence du rôle joué par les anti-TNF- α . *La Revue de Médecine Interne*, 40, A86.
140. Zohra, D. (2020). Etude comparative entre l'adsorption du fer totale par les algues vertes brutes et activées
141. de Reviere, B. (2002). Biologie et phylogénie des algues. Belin.
142. Cabioch, J., Floc'h, J. Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C. F., Meinesz, A., Verlaque, M., ... & Weed, C. W. (1992). Guide des algues des mers d'Europe : Manche/Atlantique. 1:272.
143. Gayral, P. (1975). Les algues: morphologie, cytologie, reproduction, écologie (No. 582.2 GAY).
144. Roland, J. C., Roland, F., Bouteau, F., & Bouteau, H. E. M. (2008). Atlas de biologie végétale-Tome 2-9ème édition-Organisation des plantes à fleurs. Dunod.
145. Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive compounds and properties of seaweeds—a review. *Open Access Library Journal*, 1(4), 1-17.
146. Pérez, R. (1997). Ces algues qui nous entourent: Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. Editions Quae.
147. De Jesus Raposo, M. F., de Moraes, A. M. M. B., & de Moraes, R. M. S. C. (2015). Bioactivity and applications of polysaccharides from marine Microalgae. polysaccharides. *Mar. Drugs*, 13, 2967-3028.
148. Marfaing, H., & Lerat, Y. (2007). Les algues ont-elles une place en nutrition?. *Phytothérapie*, 5(1), 2-5.
149. Aragão, G. F., Nonato, D. T. T., da Ponte, E. L., Sales, J. R., Alencar, D. B., Sampaio, S. S., ... & Assreuy, A. M. S. (2016). Protective effects of ethanolic extract from the red algae *Amansia multifida* on experimental inflammation, nociception and seizure experimental models. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 38(4), 465-471.
150. Iyer, R., Bolton, J. J., & Coyne, V. E. (2005). Gracilarioid species (Gracilariaceae, Rhodophyta) in southern Africa, with a description of *Gracilariopsis funicularis* sp. nov. *African Journal of Marine Science*, 27(1), 97-105.
151. Lahaye, M. (2001). Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *Journal of applied phycology*, 13(2), 173-184.
152. McHugh, D. J. (1991). Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. In *International workshop on Gelidium* (pp. 19-29). Springer, Dordrecht.
153. Melo, R. A. (1998). *Gelidium* commercial exploitation: natural resources and cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 10(3), 303-314.
154. Zemke-White, W. D., & Ohno, M. (1999). World seaweed utilisation: an end-of-century summary. *Journal of applied Phycology*, 11(4), 369-376.
155. Akakabe, Y., & Kajiwar, T. (2008). Bioactive volatile compounds from marine algae: feeding attractants. In *Nineteenth International Seaweed Symposium* (pp. 211-214). Springer, Dordrecht.

156. De la Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F. L., De Gálvez, M. V., & Herrera, E. (2009). Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 161-169.
157. Seo, Y. B., Lee, Y. W., Lee, C. H., & You, H. C. (2010). Red algae and their use in papermaking. *Bioresource Technology*, 101(7), 2549-2553.
158. Sun, J., Wang, Y. J., Zhu, L. Y., & Yang, R. Y. (2007). Study on antifungal and antioxidant activities of alcohol extract of *Gelidium amansii*. *Food Sci*, 28, 53.
159. Titlyanov, E. A., & Titlyanova, T. V. (2006). Production of plantlets of the red alga of *Gelidium* genus (Rhodophyta) from thallus fragments. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(5), 284-288.
160. Boulus, A., Spaneir, E., & Friedlander, M. (2007). Effect of outdoor conditions on growth rate and chemical composition of *Gelidium crinale* in culture. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 471-478.
161. Croce, M. E., Villar, M. A., & Parodi, E. R. (2015). Assessment of alternative sources of seaweed polysaccharides in Argentina: potentials of the agarophyte *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Gaillon (Rhodophyta, Gelidiales). *Journal of applied phycology*, 27(5), 2099-2110.
162. Kanekiyo, K., Hayashi, K., Takenaka, H., Lee, J. B., & Hayashi, T. (2007). Anti-herpes simplex virus target of an acidic polysaccharide, nostoflan, from the edible blue-green alga *Nostoc flagelliforme*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(8), 1573-1575.
163. Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual review of food science and technology*, 9, 345-381.
164. Shahidi, F., & Rahman, M. J. (2018). Bioactives in seaweeds, algae, and fungi and their role in health promotion. *Journal of Food Bioactives*, 2, 58-81.
165. Kalimuthu, S., & Kim, S. K. (2015). Fucoidan, a sulfated polysaccharides from brown algae as therapeutic target for cancer. In *Handbook of anticancer drugs from marine origin* (pp. 145-164). Springer, Cham.
166. PERCIVAL, E., & McDOWELL, R. H. (1990). Algal polysaccharides. In *Methods in plant biochemistry* (Vol. 2, pp. 523-547). Academic Press.
167. Noda, H. (1993). Health benefits and nutritional properties of nori. *Journal of Applied Phycology*, 5(2), 255-258.
168. Takano, R., Hayashi, K., Hara, S., & Hirase, S. (1995). Funoran from the red seaweed, *Gloiopeltis complanata*: polysaccharides with sulphated agarose structure and their precursor structure. *Carbohydrate polymers*, 27(4), 305-311.
169. Zhang, Q., Li, N., Zhou, G., Lu, X., Xu, Z., & Li, Z. (2003). In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacological Research*, 48(2), 151-155.
170. Kwon, M. J., & Nam, T. J. (2006). Porphyrin induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Sciences*, 79(20), 1956-1962.
171. Yoshizawa, Y., Enomoto, A., Todoh, H., Ametani, A., & Kaminogawa, S. (1993). Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae (*Porphyra yezoensis*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(11), 1862-1866.
172. Yoshizawa, Y., Ametani, A., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh, M., Fukui, F., & Kaminogawa, S. (1995). Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(10), 1933-1937.
173. Tsuge, K., Okabe, M., Yoshimura, T., Sumi, T., Tachibana, H., & Yamada, K. (2007). Dietary effects of porphyrin from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of Sprague-Dawley rats. *Food Science and Technology Research*, 10(2), 147-151.
174. De Clercq, E. (2000). Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medicinal research reviews*, 20(5), 323-349.
175. Witvrouw, M., Este, J. A., Mateu, M. Q., Reyman, D., Andrei, G., Snoeck, R., ... & De Clercq, E. (1994). Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 5(5), 297-303.
176. Pujol, C. A., Errea, M. I., Matulewicz, M. C., & Damonte, E. B. (1996). Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulphated galactan. *Phytotherapy Research*, 10(5), 410-413.
177. Duarte, M. E. R., Nosedá, D. G., Nosedá, M. D., Tulio, S., Pujol, C. A., & Damonte, E. B. (2001). Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. *Phytomedicine*, 8(1), 53-58.
178. Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., Errea, M. I., Matulewicz, M. C., & Damonte, E. B. (1997). Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture. *Planta medica*, 63(05), 429-432.
179. de Jesus Raposo, M. F., De Morais, A. M. B., & De Morais, R. M. S. C. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine drugs*, 13(5), 2967-3028.
180. Zhu, W., Ooi, V. E. C., Chan, P. K. S., & Ang Jr, P. O. (2003). Inhibitory effect of extracts of marine algae from Hong Kong against Herpes simplex viruses. In *Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium*, Cape Town, South Africa, 28 January-2 February 2001 (pp. 159-164). Oxford University Press.

181. Talarico, L. B., Zibetti, R. G., Faria, P. C., Scolaro, L. A., Duarte, M. E., Nosedá, M. D., ... & Damonte, E. B. (2004). Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsia* and *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1-2), 63-71.
182. Takano, R., Iwane-Sakata, H., Hayashi, K., Hara, S., & Hirase, S. (1998). Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* Post. et Ruprecht (Cryptonemiales, Rhodophyta). *Carbohydrate Polymers*, 35(1-2), 81-87.
183. Albuquerque, I. R. L., Cordeiro, S. L., Gomes, D. L., Dreyfuss, J. L., Filgueira, L. G. A., Leite, E. L., ... & Rocha, H. A. O. (2013). Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of a heterofucan from *Dictyota menstrualis*. *Marine drugs*, 11(8), 2722-2740.
184. Kraan, S. (2012). Algal polysaccharides, novel applications and outlook. IntechOpen.
185. Luescher-Mattli, M. (2003). Algae, a possible source for new drugs in the treatment of HIV and other viral diseases. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents*, 2(3), 219-225.
186. Campo, V. L., Kawano, D. F., da Silva Jr, D. B., & Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review. *Carbohydrate polymers*, 77(2), 167-180.
187. Haijin, M., Xiaolu, J., & Huashi, G. (2003). A κ -carrageenan derived oligosaccharide prepared by enzymatic degradation containing anti-tumor activity. *Journal of Applied Phycology*, 15(4), 297-303.
188. Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. D. A., Câmara, R. B. G., ... & Rocha, H. A. O. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(1), 21-28.
189. Yang, B., Yu, G., Zhao, X., Ren, W., Jiao, G., Fang, L., ... & Zhang, J. (2011). Structural characterisation and bioactivities of hybrid carrageenan-like sulphated galactan from red alga *Furcellaria lumbricalis*. *Food chemistry*, 124(1), 50-57.
190. Prajapati, V. D., Maheriya, P. M., Jani, G. K., & Solanki, H. K. (2014). RETRACTED: Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate polymers*, 105, 97-112.
191. Carlucci, M. J., Pujol, C. A., Ciancia, M., Nosedá, M. D., Matulewicz, M. C., Damonte, E. B., & Cerezo, A. S. (1997). Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(2), 97-105.
192. Carlucci, M. J., Ciancia, M., Matulewicz, M. C., Cerezo, A. S., & Damonte, E. B. (1999). Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral research*, 43(2), 93-102.
193. Pujol, C. A., Estevez, J. M., Carlucci, M. J., Ciancia, M., Cerezo, A. S., & Damonte, E. B. (2002). Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 13(2), 83-89.
194. Sen Sr, A. K., Das, A. K., Banerji, N., Siddhanta, A. K., Mody, K. H., Ramavat, B. K., ... & Ganguly, D. K. (1994). A new sulfated polysaccharide with potent blood anti-coagulant activity from the red seaweed *Grateloupia indica*. *International journal of biological macromolecules*, 16(5), 279-280.
195. Stephanie, B., Eric, D., Sophie, F. M., Christian, B., & Yu, G. (2010). Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 448-460.
196. Cáceres, P. J., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Matsuhira, B., & Zúñiga, E. A. (2000). Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity. *Phytochemistry*, 53(1), 81-86.
197. Mazumder, S., Ghosal, P. K., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., & Ray, B. (2002). Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International journal of biological macromolecules*, 31(1-3), 87-95.
198. Yoshizawa, Y., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh, M., Fukui, F., Ametani, A., & Kaminogawa, S. (1996). In vivo macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(10), 1667-1671.
199. Damonte, E., Neyts, J., Pujol, C. A., Snoeck, R., Andrei, G., Ikeda, S., ... & De Clerco, E. (1994). Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochemical pharmacology*, 47(12), 2187-2192.
200. Damonte, E. B., Matulewicz, M. C., Cerezob, A. S., & Coto, C. E. (1996). Herpes simplex virus-inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Chemotherapy*, 42(1), 57-64.
201. Kolender, A. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Matulewicz, M. C., & Cerezo, A. S. (1997). The system of sulfated α -(1 $\rightarrow$ 3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carbohydrate research*, 304(1), 53-60.
202. Bourgougnon, N., Roussakis, C., Kornprobst, J. M., & Lahaye, M. (1994). Effects in vitro of sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales) on a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6). *Cancer letters*, 85(1), 87-92.
203. Nakashima, H. Y. N. Y. M. N., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., & Yamamoto, N. (1987). Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse

- transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31(10), 1524-1528.
204. Zúñiga, E. A., Matsuiro, B., & Mejías, E. (2006). Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 208-215.
 205. Farias, W. R., Valente, A. P., Pereira, M. S., & Mourão, P. A. (2000). Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans: Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29299-29307.
 206. Toyama, M. H., Toyama, D. O., Torres, V. M., Pontes, G. C., Farias, W. R. L., Melo, F. R., ... & Cavada, B. S. (2010). Effects of low molecular weight sulfated galactan fragments from *Botryocladia occidentalis* on the pharmacological and enzymatic activity of sPLA2 from *Crotalus durissus cascavella*. *The protein journal*, 29(8), 567-571.
 207. Lins, K. O., Bezerra, D. P., Alves, A. P. N., Alencar, N. M., Lima, M. W., Torres, V. M., ... & Costa-Lotufo, L. V. (2009). Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). *Journal of Applied Toxicology*, 29(1), 20-26.
 208. Ghosh, T., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Sinha, S., & Ray, B. (2009). Sulfated xylomannans from the red seaweed *Sebdenia polydactyla*: structural features, chemical modification and antiviral activity. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 19(6), 235-242.
 209. Michel, C., & Macfarlane, G. T. (1996). Digestive fates of soluble polysaccharides from marine macroalgae: involvement of the colonic microflora and physiological consequences for the host. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(4), 349-369.
 210. Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*, 23(3), 543-597.
 211. Murata, M., & Nakazoe, J. I. (2001). Production and use of marine algae in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 35(4), 281-290.
 212. Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive compounds and properties of seaweeds—a review. *Open Access Library Journal*, 1(4), 1-17.
 213. Fernández, L. E., Valiente, O. G., Mainardi, V., Bello, J. L., Vélez, H., & Rosado, A. (1989). Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. *Carbohydrate research*, 190(1), 77-83.
 214. Chen, H. M., Zheng, L., & Yan, X. J. (2005). The preparation and bioactivity research of agaro-oligosaccharides. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 29-36.
 215. Gonçalves, A. G., Ducatti, D. R., Duarte, M. E. R., & Nosedá, M. D. (2002). Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. *Carbohydrate Research*, 337(24), 2443-2453.
 216. Van de Velde, F., Antipova, A. S., Rollema, H. S., Burova, T. V., Grinberg, N. V., Pereira, L., ... & Grinberg, V. Y. (2005). The structure of κ/ι -hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. *Carbohydrate Research*, 340(6), 1113-1129.
 217. Antonopoulos, A., Favetta, P., Helbert, W., & Lafosse, M. (2005). On-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of κ - and ι -carrageenans. Application to the hybrid ι - ν -carrageenans. *Analytical chemistry*, 77(13), 4125-4136.
 218. Zhou, G., Sun, Y., Xin, H., Zhang, Y., Li, Z., & Xu, Z. (2004). In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological research*, 50(1), 47-53.
 219. Zhou, G., Sheng, W., Yao, W., & Wang, C. (2006). Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. *Pharmacological research*, 53(2), 129-134.
 220. Carlucci, M. J., Pujol, C. A., Ciancia, M., Nosedá, M. D., Matulewicz, M. C., Damonte, E. B., & Cerezo, A. S. (1997). Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(2), 97-105.
 221. Luescher-Mattli, M. (2003). Algae, a possible source for new drugs in the treatment of HIV and other viral diseases. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents*, 2(3), 219-225.
 222. Alves, M. G. D. C. F., Dore, C. M. P. G., Castro, A. J. G., do Nascimento, M. S., Cruz, A. K. M., Soriano, E. M., ... & Leite, E. L. (2012). Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1217-1227.
 223. Damasceno, S. R., Rodrigues, J. C., Silva, R. O., Nicolau, L. A., Chaves, L. S., Freitas, A. L., ... & Medeiros, J. V. R. (2013). Role of the NO/K ATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 320-328.
 224. de Brito, T. V., Prudêncio, R. D. S., Sales, A. B., Vieira Júnior, F. D. C., Candeira, S. J. N., Franco, Á. X., ... & dos Reis Barbosa, A. L. (2013). Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from

- the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(5), 724-733.
225. Sousa, N. A., Barros, F. C. N., Araújo, T. S., Costa, D. S., Souza, L. K. M., Sousa, F. B. M., ... & Medeiros, J. V. R. (2016). The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents. *International journal of biological macromolecules*, 86, 865-875.
 226. Silva, R. O., Santana, A. P. M., Carvalho, N. S., Bezerra, T. S., Oliveira, C. B., Damasceno, S. R., ... & Medeiros, J. V. R. (2012). A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *Marine drugs*, 10(12), 2618-2633.
 227. de Souza, M. C. R., Marques, C. T., Dore, C. M. G., da Silva, F. R. F., Rocha, H. A. O., & Leite, E. L. (2007). Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of applied phycology*, 19(2), 153-160.
 228. Brito, T. V., Barros, F. C., Silva, R. O., Júnior, G. J. D., Júnior, J. S. C., Franco, Á. X., ... & Barbosa, A. L. R. (2016). Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. *Carbohydrate polymers*, 151, 957-964.
 229. Catalan-Serra, I., & Brenna, Ø. (2018). Immunotherapy in inflammatory bowel disease: novel and emerging treatments. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 14(11), 2597-2611.
 230. Asker, M. S., El Kady, E. M., & Mahmoud, M. G. (2019). New trends of the Polysaccharides as a drug. *World J Agri Soil Sci*, 3(4), 1-22.
 231. Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., ... & Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of applied phycology*, 29(2), 949-982.
 232. Hu, D. J., Cheong, K. L., Zhao, J., & Li, S. P. (2013). Chromatography in characterization of polysaccharides from medicinal plants and fungi. *Journal of separation science*, 36(1), 1-19.
 233. Watt, J., & Marcus, R. (1973). Experimental ulcerative disease of the colon in animals. *Gut*, 14(6), 506.
 234. Manlusoc, J. K. T., Hsieh, C. L., Hsieh, C. Y., Salac, E. S. N., Lee, Y. T., & Tsai, P. W. (2019). Pharmacologic application potentials of sulfated polysaccharide from marine algae. *Polymers*, 11(7), 1163.
 235. Eri, R., McGuckin, M. A., & Wadley, R. (2012). T cell transfer model of colitis: a great tool to assess the contribution of T cells in chronic intestinal inflammation. In *Leucocytes* (pp. 261-275). Humana Press.
 236. Mozaffari, S., Nikfar, S., Abdolghaffari, A. H., & Abdollahi, M. (2014). New biologic therapeutics for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Expert opinion on biological therapy*, 14(5), 583-600.
 237. Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329-342.
 238. Lean, Q. Y., Eri, R. D., Fitton, J. H., Patel, R. P., & Gueven, N. (2015). Fucoidan extracts ameliorate acute colitis. *PLoS One*, 10(6), e0128453.
 239. Pereira, L. (2018). Biological and therapeutic properties of the seaweed polysaccharides. *International Biology Review*, 2(2).
 240. Brito, T. V., Neto, J. P., Prudêncio, R. S., Batista, J. A., Júnior, J. S., Silva, R. O., ... & Barbosa, A. L. (2014). Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8), 1161-1170.
 241. Hatoum, O. A., Heidemann, J., & Binion, D. G. (2006). The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072(1), 78-97.
 242. Thomas, S., & Baumgart, D. C. (2012). Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology*, 20(1), 1-18.
 243. Herter, J., & Zarbock, A. (2013). Integrin regulation during leukocyte recruitment. *The Journal of Immunology*, 190(9), 4451-4457.
 244. Zhang, X. W., Liu, Q., & Thorlacius, H. (2001). Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 36(3), 270-275.
 245. Besednova, N. N., Zaporozhets, T. S., Kuznetsova, T. A., Makarenkova, I. D., Kryzhanovsky, S. P., Fedyanina, L. N., & Ermakova, S. P. (2020). Extracts and Marine Algae Polysaccharides in Therapy and Prevention of Inflammatory Diseases of the Intestine. *Marine Drugs*, 18(6), 289.
 246. Rezaie, A., Parker, R. D., & Abdollahi, M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?. *Digestive diseases and sciences*, 52(9), 2015-2021.
 247. Xiao, X., Wu, Z. C., & Chou, K. C. (2011). A multi-label classifier for predicting the subcellular localization of gram-negative bacterial proteins with both single and multiple sites. *PloS one*, 6(6), e20592.
 248. Hering, N. A., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *The Journal of physiology*, 590(5), 1035-1044.
 249. Loguercio, C., D'Argenio, G., Delle Cave, M., Cosenza, V., Della Valle, N., Mazzacca, G., & Blanco, C. D. V. (1996). Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*, 41(6), 1204-1211.
 250. Tahan, G., Gramignoli, R., Marongiu, F., Aktolga, S., Cetinkaya, A., Tahan, V., & Dorko, K. (2011). Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*, 56(3), 715-720.

251. Spitz, D. R., Azzam, E. I., Li, J. J., & Gius, D. (2004). Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23(3), 311-322.
252. Kolios, G., Valatas, V., & Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113(4), 427-437.
253. Gayral, P., & Cosson, J. (1986). Connaitre et reconnaitre les algues marines. Ouest-France.
254. Cabioc'h, J., Floc'h, J. Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C. F., Meinesz, A., & Verlaque, M. (2006). Guide des algues des mers d'Europe. Manche et Atlantique. Méditerranée.
255. Lloris, D., & Rucabado, J. (1998). Guide d'identification des ressources marines vivantes du Maroc. Food & Agriculture Org..
256. Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2021). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 17 September 2021.
257. Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., & Zhang, Q. (2010). Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 118-121.
258. Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K., & Maïga, A. (2004). Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam.(Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1073-1080.
259. Ruiz, G. (2005). Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges (Doctoral dissertation, Limoges).
260. Athukorala, Y., Jung, W. K., Vasanthan, T., & Jeon, Y. J. (2006). An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 184-191.
261. Ghebregzabher, M., Rufini, S., Monaldi, B., & Lato, M. (1976). Thin-layer chromatography of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 127(2), 133-162.
262. Paulsen, B. S., Olafsdóttir, E. S., & Ingólfssdóttir, K. (2002). Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. *Journal of chromatography*, 967(1), 163-171.
263. Viksø-Nielsen, A., Blennow, A., Hamborg Nielsen, T., & Lindberg Møller, B. (1998). Phosphorylated α (1 $\rightarrow$ 4) glucans as substrate for potato starch-branching enzyme I. *Plant physiology*, 117(3), 869-875.
264. Sorndech, W., Sagnelli, D., Blennow, A., & Tongta, S. (2017). Combination of amylase and transferase catalysis to improve IMO compositions and productivity. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 479-486.
265. Lehtonen, H. M., Lehtinen, O., Suomela, J. P., Viitanen, M., & Kallio, H. (2010). Flavonol glycosides of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) are bioavailable in humans and monoglucuronidated for excretion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 620-627.
266. Yang, B., Zheng, J., & Kallio, H. (2011). Influence of origin, harvesting time and weather conditions on content of inositols and methylinositols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries. *Food chemistry*, 125(2), 388-396.
267. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
268. Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
269. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
270. Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.
271. Öztürk, M., Duru, M. E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., & Özler, M. A. (2011). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1353-1360.
272. Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, 44, 307-315.
273. Jonsson, M., Jestoi, M., Nathanail, A. V., Kokkonen, U. M., Anttila, M., Koivisto, P., ... & Peltonen, K. (2013). Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. *Food and chemical toxicology*, 53, 27-32.
274. Jädert, C., Phillipson, M., Holm, L., Lundberg, J. O., & Borniquel, S. (2014). Preventive and therapeutic effects of nitrite supplementation in experimental inflammatory bowel disease. *Redox biology*, 2, 73-81.
275. Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British journal of pharmacology*, 160(7), 1577-1579.
276. Lyakhovich, A., & Gasche, C. (2010). Systematic review: molecular chemoprevention of colorectal malignancy by mesalazine. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 31(2), 202-209.
277. Paine, E. R. (2014). Colonoscopic evaluation in ulcerative colitis. *Gastroenterology report*, 2(3), 161-168.
278. Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.

- 279.Flohe, L. (1984). [10] Superoxide dismutase assays. *Methods in enzymology*, 105, 93-104.
- 280.Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- 281.Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.
- 282.Sedlak, J. (1982). Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. *Endocrinologia experimentalis*, 16(2), 103-109.
- 283.Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- 284.Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., & Hoekstra, W. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179(4073), 588-590.
- 285.Kornberg, A. (1955). [67] Lactic dehydrogenase of muscle: Pyruvate+ DPNH $\rightleftharpoons$ Lactate+ DPN.
- 286.Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- 287.avrushyan, H., Avtandilyan, N., Mamikonyan, A., & Trchounian, A. (2017). The change of polyamines and nitric oxide quantities in human blood serum of prostate and bladder cancer. *Հայաստանի կենսաբանական հաֆնդու*, 69(1), 125-132.
- 288.Beckman, J. S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., ... & Tsai, M. (1992). Kinetics of superoxide dismutase-and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics*, 298(2), 438-445.
- 289.Vodovotz, Y. (1996). Aging of starch and bread as studied by DSC, DMA, NMR and confocal microscopy. *University of Massachusetts Amherst*.
- 290.Cortas, N. K., & Wakid, N. W. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clinical chemistry*, 36(8), 1440-1443.
- 291.Wink, D. A., Kim, S., Coffin, D., Cook, J. C., Vodovotz, Y., Chistodoulou, D., ... & Grisham, M. B. (1999). [21] Detection of S-nitrosothiols by fluorometric and colorimetric methods. *Methods in enzymology*, 301, 201-211.
- 292.Bradley, P. P., Priebe, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, 78(3), 206-209.
- 293.Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., & Wallace, J. L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96(2), 795-803.
- 294.Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., & Delgado, M. (2006). Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology*, 130(6), 1707-1720.
- 295.Xu, L., Yang, Z. L., Li, P., & Zhou, Y. Q. (2009). Modulating effect of Hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *Phytomedicine*, 16(10), 989-995.
- 296.Meyerholz, D. K., & Beck, A. P. (2018). Fundamental concepts for semiquantitative tissue scoring in translational research. *ILAR journal*, 59(1), 13-17.
- 297.Hanfer, M., Ameddah, S., & Morin, D. (2017). L'effet protecteur de la plante *Linaria tingitana* (Scrophulariaceae) sur le dysfonctionnement mitochondrial et lysosomal hépato cytaire induit par l'acide valproïque chez le rat (Doctoral dissertation).
- 298.Osman, A. M., Wong, K. K. Y., & Fernyhough, A. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1), 321-329.
- 299.Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(1), 27-32.
- 300.Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- 301.Boumba, L. S., Ntandou, G. N., Loufoua, A. B., Makambila, M. C., & Abena, A. A. (2018). Toxicité aiguë, effets anti-inflammatoire et analgésique de l'extrait aqueux de *Heinsia crinita* (Afzel.) G. Taylor (Rubiaceae). *Phytothérapie*, 16(S1), S8-S16.
- 302.Cushing, K., & Higgins, P. D. (2021). Management of Crohn Disease: A Review. *JAMA*, 325(1), 69-80.
- 303.Strober, W., Fuss, I. J., & Blumberg, R. S. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual review of immunology*, 20(1), 495-549.
- 304.Kwon, H. S., Oh, S. M., & Kim, J. K. (2008). Glabridin, a functional compound of liquorice, attenuates colonic inflammation in mice with dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 151(1), 165-173.
- 305.Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702.
- 306.Piechota-Polanczyk, A., & Fichna, J. (2014). The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(7), 605-620.
- 307.Pravda, J. (2005). Radical induction theory of ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(16), 2371.

308. Shtukmaster, S., Ljubuncic, P., & Bomzon, A. (2010). The effect of an aqueous extract of *Teucrium polium* on glutathione homeostasis in vitro: a possible mechanism of its hepatoprotectant action. *Advances in pharmacological sciences*, 2010.
309. Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. C., & Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 277S-283S.
310. Luo, Y., Peng, B., Wei, W., Tian, X., & Wu, Z. (2019). Antioxidant and anti-diabetic activities of polysaccharides from guava leaves. *Molecules*, 24(7), 1343.
311. Barros-Gomes, J. A. C., Nascimento, D. L. A., Silveira, A. C. R., Silva, R. K., Gomes, D. L., Melo, K. R. T., ... & Rocha, H. A. O. (2018). In Vivo evaluation of the antioxidant activity and protective action of the seaweed *Gracilaria Birdiae*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
312. Alencar, P. O. C., Lima, G. C., Barros, F. C. N., Costa, L. E., Ribeiro, C. V. P., Sousa, W. M., ... & Freitas, A. L. P. (2019). A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: In vitro and in vivo activities. *Food Hydrocolloids*, 90, 28-34.
313. Choi, D. S., Athukorala, Y., Jeon, Y. J., Senevirathne, M., Cho, K. R., & Kim, S. H. (2007). Antioxidant activity of sulfated polysaccharides isolated from *Sargassum fulvellum*. *Preventive Nutrition and Food Science*, 12(2), 65-73.
314. Jaballi, I., Sallem, I., Feki, A., Cherif, B., Kallel, C., Boudawara, O., ... & Amara, I. B. (2019). Polysaccharide from a Tunisian red seaweed *Chondrus canaliculatus*: Structural characteristics, antioxidant activity and in vivo hemato-nephroprotective properties on maneb induced toxicity. *International journal of biological macromolecules*, 123, 1267-1277.
315. Rupérez, P., Ahrazem, O., & Leal, J. A. (2002). Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(4), 840-845.
316. Kim, J. H., Lee, J. E., Kim, K. H., & Kang, N. J. (2018). Beneficial effects of marine algae-derived carbohydrates for skin health. *Marine drugs*, 16(11), 459.
317. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
318. Hentati, F., Delattre, C., Ursu, A. V., Desbrières, J., Le Cerf, D., Gardarin, C., ... & Pierre, G. (2018). Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Carbohydrate polymers*, 198, 589-600.
319. Vasantharaja, R., Abraham, L. S., Gopinath, V., Hariharan, D., & Smita, K. M. (2019). Attenuation of oxidative stress induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in fibroblast cells by sulfated polysaccharide from *Padina gymnospora*. *International journal of biological macromolecules*, 124, 50-59.
320. Wang, J., Liu, L., Zhang, Q., Zhang, Z., Qi, H., & Li, P. (2009). Synthesized oversulphated, acetylated and benzoylated derivatives of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity in vitro. *Food Chemistry*, 114(4), 1285-1290.
321. Stamler, J. S., & Hausladen, A. (1998). Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nature structural biology*, 5(4), 247-249.
322. Biswas, S., Ghosh, S., Samanta, A., Das, S., Mukherjee, U., & Maitra, S. (2020). Bisphenol A impairs reproductive fitness in zebrafish ovary: Potential involvement of oxidative/nitrosative stress, inflammatory and apoptotic mediators. *Environmental Pollution*, 267, 115692.
323. Marshall, H. E., Merchant, K., & Stamler, J. S. (2000). Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *The FASEB Journal*, 14(13), 1889-1900.
324. Haklar, G., Sayin-Özveri, E., Yüksel, M., Aktan, A. Ö., & Yalçın, A. S. (2001). Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer letters*, 165(2), 219-224.
325. Pryor, W. A., & Squadrito, G. L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 268(5), L699-L722.
326. Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of biochemistry and biophysics*, 356(1), 1-11.
327. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., & Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(5), 463-488.
328. Muthas, D., Reznichenko, A., Balendran, C. A., Böttcher, G., Clausen, I. G., Kärrman Mårdh, C., ... & Berner Hansen, M. (2017). Neutrophils in ulcerative colitis: a review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 52(2), 125-135.
329. Bouguen, G., Chevaux, J. B., & Peyrin-Biroulet, L. (2011). Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(5), 547.
330. Andrews, J. M., Travis, S. P., Gibson, P. R., & Gasche, C. (2009). Systematic review: does concurrent therapy with 5-ASA and immunomodulators in inflammatory bowel disease improve outcomes?. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 29(5), 459-469.
331. Jean, L., Audrey, M., & Beauchemin, C. (2018). Economic evaluations of treatments for inflammatory bowel diseases: A literature review. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018.

332. Zhong, Q., Wei, B., Wang, S., Ke, S., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2019). The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview. *Marine drugs*, 17(12), 674.
333. Zhao, C., Wu, Y., Yang, C., Liu, B., & Huang, Y. (2015). Hypotensive, hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of bioactive compounds from microalgae and marine micro-organisms. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(8), 1705-1717.
334. Lima, R. L., Pires-Cavalcante, K. M. D. S., Alencar, D. B., Viana, F. A., Sampaio, A. H., & Saker-Sampaio, S. (2016). In vitro evaluation of antioxidant activity of methanolic extracts obtained from seaweeds endemic to the coast of Ceará, Brazil. *Acta Scientiarum. Technology*, 38(2), 247-255.
335. Caicai, K., Limin, H., Liming, Z., Zhiqiang, Z., & Yongwu, Y. (2018). Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from the leaves of maca (*Lepidium Meyenii*). *International journal of biological macromolecules*, 107, 2611-2619.
336. Khemakhem, I., Abdelhedi, O., Trigui, I., Ayadi, M. A., & Bouaziz, M. (2018). Structural, antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides extracted from olive leaves. *International journal of biological macromolecules*, 106, 425-432.
337. Billmeier, U., Dieterich, W., Neurath, M. F., & Atreya, R. (2016). Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*, 22(42), 9300.
338. Rawla, P., Sunkara, T., & Raj, J. P. (2018). Role of biologics and biosimilars in inflammatory bowel disease: current trends and future perspectives. *Journal of inflammation research*, 11, 215.
339. Nielsen, O. H., & Munck, L. K. (2007). Drug insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*, 4(3), 160-170.
340. Ham, M., & Moss, A. C. (2012). Mesalamine in the treatment and maintenance of remission of ulcerative colitis. *Expert review of clinical pharmacology*, 5(2), 113-123.
341. Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P. T., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., ... & De Simone, A. (2017). Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science*, 358(6369), 1440-1443.
342. Li, M., van Esch, B. C., Wagenaar, G. T., Garssen, J., Folkerts, G., & Henricks, P. A. (2018). Pro-and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *European journal of pharmacology*, 831, 52-59.
343. Carvalho, G. B., Drago, I., Hoxha, S., Yamada, R., Mahneva, O., Bruce, K. D., ... & William, W. J. (2017). The 4E-BP growth pathway regulates the effect of ambient temperature on *Drosophila* metabolism and lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), 9737-9742.
344. Quintans, J. D. S. S., Menezes, P. P., Santos, M. R. V., Bonjardim, L. R., Almeida, J. R. G. S., Gelain, D. P., ... & Quintans-Júnior, L. J. (2013). Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine*, 20(5), 436-440.
345. Hur, S. J., Kang, S. H., Jung, H. S., Kim, S. C., Jeon, H. S., Kim, I. H., & Lee, J. D. (2012). Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutrition research*, 32(11), 801-816.
346. Quintans, J. S., Shanmugam, S., Heimfarth, L., Araújo, A. A. S., Almeida, J. R. D. S., Picot, L., & Quintans-Júnior, L. J. (2019). Monoterpenes modulating cytokines-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 233-257.
347. Teng, Z., Qian, L., & Zhou, Y. (2013). Hypolipidemic activity of the polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 254-256.
348. Cho, M., Lee, H. S., Kang, I. J., Won, M. H., & You, S. (2011). Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chemistry*, 127(3), 999-1006.
349. Yu, G., Hu, Y., Yang, B., Zhao, X., Wang, P., Ji, G., ... & Guan, H. (2010). Extraction, isolation and structural characterization of polysaccharides from a red alga *Gloiopeltis furcata*. *Journal of Ocean University of China*, 9(2), 193-197.
350. Long, X., Hu, X., Liu, S., Pan, C., Chen, S., Li, L., ... & Yang, X. (2021). Insights on preparation, structure and activities of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide. *Food Chemistry: X*, 100153.
351. Ren, Y., Zheng, G., You, L., Wen, L., Li, C., Fu, X., & Zhou, L. (2017). Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a polysaccharide isolated from *Gracilaria lemaneiformis*. *Journal of Functional Foods*, 33, 286-296.
352. Yu, G., Zhang, Q., Wang, Y., Yang, Q., Yu, H., Li, H., ... & Fu, L. (2021). Sulfated polysaccharides from red seaweed *Gelidium amansii*: Structural characteristics, anti-oxidant and anti-glycation properties, and development of bioactive films. *Food Hydrocolloids*, 119, 106820.
353. Khongthong, S., Theapparat, Y., Roekngam, N., Tantisuwanno, C., Otto, M., & Piewngam, P. (2021). Characterization and immunomodulatory activity of sulfated galactan from the red seaweed *Gracilaria fisheri*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 705-714.
354. Baptista, S. L., Romaní, A., Oliveira, C., Ferreira, S., Rocha, C. M., & Domingues, L. (2021). Galactose to tagatose isomerization by the l-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis*: A biorefinery approach for *Gelidium sesquipedale* valorisation. *LWT*, 151, 112199.

ANNEX

Caractérisation quantitative des polysaccharides par HPAEC-PAD

Sugar	Area STD	Area R1	Area R2
Fucose	3,8683	0,0000	0,0000
Arabinose	4,0532	0,0000	0,0000
Rhamnose	2,6775	0,0000	0,0000
Galactose	7,5337	9,8448	10,3022
Glucose	7,1209	0,3641	0,6460
Xylose	6,8562	0,2248	0,1328
Mannose	4,4868	0,0000	0,0000
Galactoronic acid	0,1052	0,1939	0,1751
Glucoronic acid	1,7323	0,3402	0,3904

	AVERAGE	
var Sugar	Area STD	Gelidium
Fucose	3,8683	0
Arabinose	4,0532	0
Rhamnose	2,6775	0
Galactose	7,5337	10,0735
Glucose	7,1209	0,50505
Xylose	6,8562	0,1788
Mannose	4,4868	0
Galactoronic acid	0,1052	0,1845
Glucoronic acid	1,7323	0,3653
sum	38,4341	11,3072

Samples concentrations mg/ml		
var Sugar	STD	Gelidium
Fucose	0.1mg/ml	0
Arabinose	0.1mg/ml	0
Rhamnose	0.1mg/ml	0
Galactose	0.1mg/ml	1,337125
Glucose	0.1mg/ml	0,070925
Xylose	0.1mg/ml	0,026079
Mannose	0.1mg/ml	0
Galactoronic acid	0.1mg/ml	1,753802
Glucoronic acid	0.1mg/ml	0,210876
	total	3,398807

	mol %	C/M
var Sugar	STD	Gelidium
Fucose	0.1mg/ml	0
Arabinose	0.1mg/ml	0
Rhamnose	0.1mg/ml	0
Galactose	0.1mg/ml	40,9845
Glucose	0.1mg/ml	2,17394
Xylose	0.1mg/ml	0,95921
Mannose	0.1mg/ml	0
Galactoronic acid	0.1mg/ml	49,8843
Glucoronic acid	0.1mg/ml	5,99805
total		100

Année universitaire : 2021/2022	Présentée par : BOUAMEUR Somia
Intitulé Le potentiel biologique préventif des polysaccharides issus de <i>Gelidium spinosum</i> récoltée des cotes de la région de Jijel	
Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle LMD Option : Physio-Toxicologie Cellulaire	
RESUME L'étude des polysaccharides issus de la flore algale couvrant le littoral de l'Est algérien demeure minime. Pour cette raison, la présente investigation s'engage à explorer le potentiel antioxydant et anti-inflammatoires des polysaccharides issues d'une espèce appartenant aux algues rouges (les rhodophycées) <i>Gelidium spinosum</i> collectée de la zone de Beni Belaid (willaya de Jijel). L'extrait polysaccharidique de <i>Gelidium spinosum</i> (EPGS) a prouvé un effet antioxydant important, élucidé par plusieurs tests <i>in vitro</i> (L'effet scavenger du DPPH°, l'effet scavenger de l'ABTS°+ et le pouvoir réducteur). L'étude <i>in vivo</i> a été réalisée en utilisant des souris prétraitées par le EPGS / mésalazine par une dose orale de 60 /75 mg Kg durant 7 jours; puis traitées par le DSS (2,5 %) pendant 7 jours. Les résultats obtenus ont révélé que le EPGS diminue les symptômes de la colite ulcéreuse induite par le DSS (indice d'activité de la maladie; DAI). Les effets protecteurs significatifs du EPGS ont été associés par une réduction de l' MDA et un rétablissement de l'activité de LDH, une amélioration remarquable des activités de la SOD et de la CAT et une restauration d'enzymes métabolisant le glutathion (GPx, GST) au niveau du tissu du côlon. Concernant l'aspect anti-inflammatoire, l'EPGS a prouvé une capacité de piégeage du NO et des peroxy-nitrites. Le prétraitement avec l'EPGS a normalisé les marqueurs du stress nitrosatif, (NO, S-nitrosothiol et le peroxy-nitrite) et a atténué significativement les taux des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IL-6) et l'activité de la MPO. La cohérence des propriétés biologiques et les mécanismes d'action de cette extrait sont liés probablement à la richesse diversifiée de l'extrait algal de cette espèce en terme de polysaccharides bioactives confirmé via l'analyse chimique de EPGS par HPAEC-PAD qui a montré que son profil monosaccharidique est caractérisé une prédominance du galactose et de l'acide galacturonique, et de l'acide glucuronique qui peuvent moduler en synergie l'effet des différentes complications induites par le DSS.	
Mots clés : <i>Gelidium spinosum</i>, anti-inflammatoire, Dextran Sulfate sodium, stress nitrosatif, stress oxydatif.	
Laboratoire de recherche : Biologie et Environnement (LBE) Université des Frères Mentouri Constantine1	



Egyptian Journal of Chemistry

<http://ejchem.journals.ekb.eg/>

Gelidium spinosum red algae ameliorates oxidative /nitrosative stress and inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice



Somia Bouameur^a, Ahmed Menad^a, TakiEddine Hamadou^a, Bodil Jørgensen^b, Souad Ameddah^{a*}

^a Laboratory of Biology and Environment, Faculty of Nature and Life Sciences, University Mentouri Brothers Constantine 1 BP, 325 Ain El bey way, Constantine 25017-Algeria.

^b Department of Plant and Environment Sciences, Faculty of Science, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark.

Abstract

Ulcerative colitis is characterized by oxidative / nitrosative stress and leukocyte infiltration which are shown to be important factors in the etiopathogenesis of colitis. The aim of this study was to evaluate the protective mechanism of the polysaccharide (PLS) fraction extracted from the seaweed *Gelidium spinosum* (PEGS) in Dextran Sulfate sodium; DSS-induced ulcerative colitis in male Swiss albino mice. The in vivo study was carried out with mice (pretreated with PEGS/mesalazine orally at 60 mg/75 Kg; 7 days; then 2.5 % (DSS); 7 days). Clinical symptoms (disease activity index; DAI), oxidative, nitrosative stress and inflammatory parameters were evaluated. The results revealed that PEGS lowered the symptoms of ulcerative colitis induced by DSS by reducing malondialdehyde, nitrosative, and pro-inflammatory biomarkers (NO, S-nitrosothiol, peroxynitrite, TNF- α and IL-6). These significant protective effects of PEGS was associated with a remarkable decrease of the level of myeloperoxidase in a significant way. PEGS effectively increased the superoxide dismutase and catalase activities, and restored the glutathione metabolizing enzyme (glutathione peroxidase, glutathione S-transferase) in the colon tissue. In conclusion, these findings suggest that PEGS exerts beneficial effects in experimental colitis, and therefore we propose that it could be a potential drug in treating ulcerative colitis.

Keywords: anti-inflammatory, Dextran Sulfate sodium, *Gelidium spinosum*, nitrosative stress, oxidative stress, ulcerative colitis.

1. Introduction

Marine algae are known for their large production of sulfate polysaccharides, as a component of their cell walls, widely used in the food and pharmaceutical industry [1]. Various studies have shown that marine algae are rich sources of various bioactive compounds among them polysaccharides which have demonstrated antioxidant and anti-inflammatory effects [2][3]. *Gelidium spinosum* (S. Gmelin) P. Silvais Member of the red algal family Gelidiaceae are distributed from intertidal to subtidal habitats and occur in most oceans, including tropical, warm, and cool temperate waters [4]. Although they are absent from polar waters. Several *Gelidium* are distributed worldwide, and are even found in cold temperate areas as far apart as the Falklands and south-western Norway [5]. *Gelidium* is harvested in large quantities in subtropical waters such as in Japan, Korea, Spain, Portugal and Morocco [6]. *Gelidium* is the most speciose genus in the family that currently includes

134 species [7] [8]. Although the diverse uses of *Gelidium* as food and in the production of agar and paper pulp have increased research interest in this genus [9]. Other studies showed that *Gelidium spinosum* possess antimicrobial, antiviral, antifungal, cytotoxic activities [10], and antioxidant activity [11]. Inflammatory bowel diseases (IBDs) is hypothesized to be related to exposure to environmental risk factors leading to inappropriate immune responses to enteric commensal microbes in genetically susceptible individuals [12]. Ulcerative colitis (UC) is one of the two main forms of IBDs which is characterized by inadequate activation of the intestinal and systemic immune system which results in deregulation of mucosal immunology [13]. Recent studies have exhibited that reactive oxygen species (ROS), nitrogenous species (RNS), and inflammatory pathway disorders may be involved in the pathogenesis of UC, and they are emerging as new therapeutic targets for the treatment of UC [14]. The

*Corresponding author e-mail: amedsouad@yahoo.fr; (Souad Ameddah).

EJCHEM use only: Receive Date: 06 August 2021, Revise Date: 07 September 2021, Accept Date: 25 September 2021

DOI: [10.21608/ejchem.2021.88910.4293](https://doi.org/10.21608/ejchem.2021.88910.4293)

©2022 National Information and Documentation Center (NIDOC)

DSS colitis mouse model is widely used to study the etiology of UC due to the fact that many pathological symptoms cited with this model are commonly noted from UC in humans [15]. Experimental DSS-induced colitis in mice aims to design a model of acute intestinal injury that mimics multiple intestinal lesions consistent with IBDs [16]. Current therapeutic strategies for management of IBDs encompass pharmacological interventions, including anti-inflammatory drugs, immunosuppressives, antibiotics, and biological therapies. The aminosalicylates and/or glucocorticoids remain the main treatment for IBD [17]. However, current therapies of IBD employing this approach has had limited success and are linked to unwanted side effects [18]. Accordingly, the use of natural products are fast becoming an attractive approach for the treatment of inflammatory bowel disease and new types of therapies are desired which can prevent disease or relapse. Algeria is characterized by algal diversity due to its geographical location and its rich topography. However, the characterization of polysaccharides extracted from Algerian seaweed has not yet been fully determined except for some research in this area.

In view of these considerations, this study aims to appraise and to evaluate for the first time the mechanisms by which polysaccharide fraction extracted from red algae *Gelidium spinosum* (PEGS) influences intestinal recovery, thus, the main purpose of this study was first to investigate whether PEGS is able to reduce oxidative and nitrosative stress-induced by DSS in the Colonial mucosa of mice through the activation of key enzymes associated with the maintenance of glutathione, on the other hand, the inflammatory modulation.

2. Experimental

2.1. Algae material collection

The marine algae *Gelidium spinosum* class of rhodophyceae (red algae) was identified by associate professors Nina Lundholm and Ruth Nielsen from the Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen. *G. spinosum* was collected in March 2016 from the northeast coast (Altitude: N 36°53'20.74"; Longitude: E 006°07'47.52") of Algeria (Jijel, "Beni Belaid") 20 meters of depth. After collection, algae were rinsed directly with seawater to remove the macroscopic epiphytes and other extraneous matter, and then rinsed in tap water and dried at room temperature and darkness.

2.2. Extraction of crude polysaccharide

40 g of algae powder was dipped in 1: 20 volumes (800 mL) of distilled water at 90 °C for 3 h. The mixture was filtered using a cheesecloth; further, the

supernatant was separated from the algae residue by centrifugation at 8000 rpm for 15 min. The residue was re-extracted in a similar way, the supernatants were combined and dialyzed in cellulose membrane (molecular weight cut of 12.000 KDa) extensively (24h) against distilled water. The polysaccharide was precipitated with the twice volume of 95 % alcohol (ethanol) overnight, then centrifuged at 3500 rpm for 30 min; the precipitate was washed with alcohol (100 °C) followed by drying under hot airflow at 60 °C [19]. This procedure was repeated according to the experimental needs. The polysaccharide extracted from *Gelidium spinosum* (PEGS) was performed for the in vivo studies.

The polysaccharide extraction yield (Y) was calculated as follows:

$$Y(\%) = \frac{(100 \times W_{\text{PEGS}})}{W_{\text{sample}}}$$

Where W-PEGS is the weight of the PEGS and W-sample is the weight of the sample.

2.3. Acute toxicity evaluation of PEGS

Five mice were used which received a single oral dose of 2000 mg/kg of PEGS. The animals were kept overnight fasting prior to administration of PEGS by oral gavage. The animals were observed individually at least once during the first 30 min after dosing, then periodically during the first 24 h (with special attention for the first 4 hours), and daily thereafter for a period of 14 days. General behavioural changes, common side effects such as mild diarrhea, weight loss needed to be detected [20]

2.4. Induction of Ulcerative colitis in mice

Animals and experimental design

Forty adult male Swiss albino mice, weighing (28±2 g) were used as experimental animals. All the animals were kept under standard laboratory conditions (temperature 25±2 °C and 12 h light/12 h dark cycle). They were fed with a standard rodent pellet diet and water ad libitum. The in vivo experimental protocol was approved by the Institutional Project Committee (PRFU, D01N01UN250120190002). The experimental procedures adopted in this study was in strict compliance with the Guidelines for Reporting Animal Research [21]. Animals was divided into four equal groups (n = 10 per group).

Group I (control - mice group), received orally normal drinking water for 14 days.

Group II (DSS - mice group the animals, after successive oral administration of normal drinking

water for 7 days, had free access to water containing DSS (2.5%, w/v) for seven days[22].

Group III (PEGs -mice group), the animals received orally 60 mg/Kg [23] [24] PEGs for 7 days, the colitis was induced in the same way as in group II. Group IV (Mesalazine-mice group) the animals received mesalazine at 75 mg/Kg as a reference drug[25] for 7 days, acute colitis was induced in the same manner as in group II. During the experimental period, the mice were checked daily for colitis as the disease activity index (DAI) based on monitoring body weight, gross rectal bleeding, and stool consistency.

At the end of the experiment on day 15, the mice were killed by cervical dislocation, and the colon was excised, and the length of each colon was measured, the colon tissues were dissected for further analysis. The remainder of each sample was stored at -80 °C for biochemical analyses.

2.5. Sample preparation

The distal portion of the colon (8 cm; 190–200 mg) was excised, and were diluted 20 % w/v in 20 mM cold Tris-HCl, pH 7.4, and homogenized using a Teflon homogenizer, the homogenates were centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min at 4 °C to separate cytosolic fraction that was stored at -80 °C until use[26].

2.6. Lactate dehydrogenase (LDH) activity

The LDH activity in the colonic tissue was estimated according to Kornberg [27]. The substrate used was sodium pyruvate; the pH of the buffer was maintained at 7.5 at 37 °C. In the presence of an enzyme, pyruvic acid is converted into lactic acid. Further, pyruvic acid reacts with 2,4-dinitrophenylhydrazine and forms an intensely colored brown hydrazone, which has a high absorbance at 400–500 nm. The LDH activity was expressed as U/g tissue. The protein content of each sample was estimated by the method of Lowry [28], using the bovine serum albumin as a standard.

2.7. Oxidative stress studies

Measurement of malondialdehyde (MDA) level, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities.

The amount of MDA was assessed as the generation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) which were determined by measuring the optical density of the supernatant at 535 nm. The amount of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; the results were expressed as nmol/mg protein [29]. The SOD activity was assayed using the method of

Marklund and Marklund [30] using the inhibition of pyrogallol autoxidation, the enzyme activity was expressed as units/mg protein at 420 nm, one unit of SOD activity was defined that inhibits the auto-oxidation of pyrogallol by 50 %. The CAT activity was determined from the rate of decomposition of H_2O_2 , monitored by a decrease of 240 nm [31], the activity was expressed as units/mg protein ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protein}$).

Measurement of glutathione-metabolizing enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) activities.

Reduced glutathione (GSH) levels were estimated by the method of Ellman [32] and Sedlak [33]. The estimation of GSH levels was based on the reaction of GSH with DTNB producing a yellow complex estimated at 412 nm. The GSH levels were calculated using an extinction coefficient of $13,600 \text{ mol}/\text{cm}$, the values were expressed as nmol/mg protein. The GST activity was assayed by quantifying the conjugate glutathione resulting from the conjugation of CDNB with GSH following the method of Habig [34]. The GST activity was monitored at 340 nm for 3 min. The enzyme activity was expressed as units/mg protein, one unit of GST activity was defined as $\mu\text{moles CDNB conjugate formed}/\text{min}/\text{mg protein}$ using a molar extinction coefficient of $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. The GPx activity was determined by the method of Rotruck

[35] based on the degradation of H_2O_2 in the presence of GSH, the enzyme activity was expressed as units/mg protein, one unit of GPx activity was defined as nmol GSH/mg protein.

2.8. Nitrosative stress markers

Measurement of nitric oxide, s-nitrosothiol and peroxynitrite

Sample preparation may be one of the most important steps in quantifying any and all NO metabolites regardless of the method employed. All steps of tissue preparation should occur under reduced ambient lighting conditions: to minimize photolytic decomposition of tissue NO products, tissue homogenates should be kept on ice in the dark and immediately analyzed within 2 min. It is best to analyze samples immediately on harvesting. Tissues should be perfused free of blood with NEM/EDTA PBS and whole tissues immediately snap-frozen in an aliquot of the NEM/EDTA perfusion buffer; The tissues can then be thawed and homogenized immediately before analysis[36][37].

Production of NO was evaluated by measuring the level of nitrite (an indicator of NO) in the colonic mucosa supernatants using Griess reagent as described by Cortas and Wakid[38]. The concentration of nitrite in the sample was determined from a NaNO_2 standard

curve and was expressed as nmol/mg protein. S-nitrosothiol measurement was performed by using the colorimetric method described by Wink [39], based on the reaction of the Griess reagent with Hg^{2+} ions. The absorbance of the resulting complex was measured at 490 nm. The results were expressed as nmol/mg protein. The level of peroxynitrite was assayed according to the method described by Beckman [40]. The basis of the assay was peroxynitrite-mediated nitration of phenol resulting in nitrophenol formation. The absorbance of the obtained complex were measured at a 320-nm wavelength, the results were expressed as $\mu\text{mol/mg}$ protein.

2.9. Inflammation markers assessment Cytokines assessment in colon

For the determination of cytokines in the colonic mucosa, protein extracts were obtained by homogenization of the colonic mucosa (0.5 mg tissue/mL) in 50 mM Tris HCl, pH 7.4, 0.5 mM dithiothreitol, and 10 $\mu\text{g/mL}$ cocktail of proteinase inhibitors containing phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin, and leupeptin. Samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at 4°C , and the supernatants were stored at -80°C until assay. Levels of the cytokines, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined by a specific sandwich ELISA using capture/biotinylated detection. Antibodies from BD Biosciences were used according to the manufacturer's recommendations [41].

2.10. Myeloperoxidase (MPO) activity

Colonic MPO is a marker for neutrophils, was evaluated according to the method of Bradley [42]. Colonic tissue samples were homogenized by suspending the colon sections in HTAB buffer (0.5 % HTAB in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6). 0.50 mg of tissue/mL was freeze-thawed three times using Ultra Turrax. The homogenates were centrifuged (15 min, $13200 \times g$, 4°C) and the supernatants were transferred to new test tubes. 100 μL of supernatant were added on test tubes, followed by 2.9 mL 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6), containing 0.167 mg/mL of O-dianisidine hydrochloride and 0.0005 % H_2O_2 . Absorbance was measured at 400 nm after 5, 10, and 15 minutes. The results were expressed as MPO U/mg protein, one unit of MPO activity was defined as the amount that degraded 1 mmol peroxidase per minute.

2.11. Statistical analysis

Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Data were analyzed using a one-way analysis of the variance test (One-way ANOVA)

followed by Honest significant difference test (HSD) of Tukey used as post hoc test to compare significance between groups at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, using the Open stat 2014 program. All in vitro assay reactions were performed in triplicate; $n=10$ for in vivo studies. Values of $p < 0.05$ was regarded as significant.

3. Results and Discussion

During the extraction of polysaccharides from *Gelidium spinosum*, Polysaccharide gelation occurred rapidly and the total yield was 4.2 %. Regarding other research the yield can be varied seasonally and also it's depend on the method of extraction (water extraction, ethanol extraction, acetic acid extraction ...), in addition to other different conditions of extraction like time and temperature.

According to Khatulistiwa [43], 2.52 % is the yield percentage obtained from *Gelidium* sp. That was extracted by maceration method. Under different conditions, Croce [44] revealed that the yield of extraction of polysaccharides extracted with water extraction+boiled method from *Gelidium* was 8.62%, Mollion [45] reported that *Gelidium madagascariense* showed a yield of 1.6% when extracted with a Cold extract and 1.5% with an Ethanol extract method.

Table 1. Extraction of crude polysaccharide

Algae	Extraction	Yield
<i>Gelidium spinosum</i>	Polysaccharides	4.2 %

3.1. Evaluation of acute toxicity of PEGS

Acute oral administration of PEGS was found to be safe up to a dose of 2000 mg/kg, p.o. During the following 14 days after, administration of PEGS produced no signs of acute toxicity in treated animals; no mortality and no abnormal behavior were noted. The dose of 60 mg/kg of PEGS was selected for the evaluation of colon protective activities.

3.2. Effect of PEGS on the disease activity index (DAI) and colon length

After 7 days of exposure to 2.5 % DSS in drinking-water, the DSS group developed the clinical symptoms of acute colitis, as indicated by the high significance ($p < 0.05$.) DAI (weight loss, diarrhea, and rectal bleeding) scoring (5.05 ± 0.19) when compared to the control group (0.68 ± 0.08) (Figure 1). In addition, the colon length was found to be 5.3 ± 0.32 cm, significantly ($P < 0.01$) shorter in the DSS group than that of control mice (6.85 ± 0.56 cm). Pretreatment with 60 mg/kg of PEGS reversed (59.71 %) the DAI score and prevented colon shortening (60 %) significantly ($P < 0.01$) as compared with those of mesalazine group (83.95 %; 70.32 %) (Fig. 1).

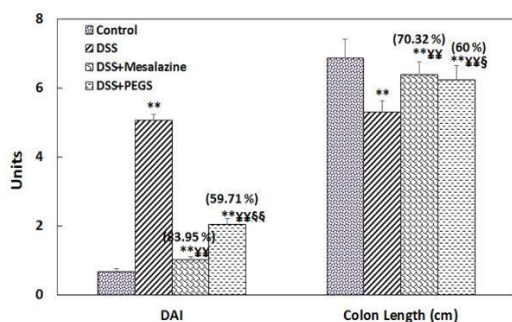


Fig 1. Effect of PEGS and mesalazine on disease activity Index(DAI) and colon length. Values are mean $\pm$ SD, (n = 10). (** p <0.01): DSS-group vs control groups; (* p <0.01): DSS group vs DSS + mesalazine; (§ p <0.01): DSS group vs DSS + PEGS). Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as: 100 x (values of DSS)-values of samples / (values of DSS)-values of control.

3.3. Effect of PEGS on oxidative stress markers in the colonic mucosa of mice TBARS and LDH Levels

Fig. 2 showed that the level of TBARS was significantly (P < 0.01) increased in DSS colonic mucosa by about 2.17 fold. However, the activity of LDH was decreased by about 1.62 fold, as compared to the healthy colonic mucosa. Pretreatment of mice with the PEGS (60 mg/kg) or mesalazine (75 mg/Kg) orally decreased significantly (P < 0.01) the level of MDA up to 75.54 % and restored (60.97 %) the LDH activity as compared to mesalazine (84.78 %; 80.48%) respectively.

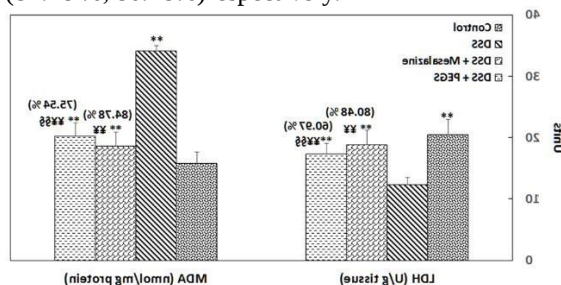


Fig 2. The effect of PEGS (60 mg/Kg) on MDA and LDH levels in DSS-group. Values are mean $\pm$ SD, (n = 10). (** p <0.01): DSS- group vs control groups; (* p <0.01): DSS group vs DSS + mesalazine; (§ p <0.01): DSS group vs DSS + PEGS). Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as: 100 x (values of DSS)-values of samples / (values of DSS)-values of control.

3.4. SOD and CAT activities

Fig. 3a showed that the exposure of the mice to DSS 2.5 % caused a significant (P <0.01) reduction in SOD and CAT activities of colonic mucosa (1.75 and 2.3 folds respectively). However, pretreatment with PEGS restored the SOD and CAT activities (55.22 %, 69.14

%; P <0.01) respectively as compared to mesalazine (82.08 %; 85.71 %; P <0.01 %) respectively.

3.5. Glutathione and Glutathione-metabolizing enzymes.

DSS treatment clearly depleted the colonic mucosa GSH level and reduced the GSH-related enzymes as evidenced by the decline in the GST and GPx levels [Figure 3b]. Pretreatment of rats with 60 mg/kg of PEGS efficacy restored the GSH level and GSH- system enzymes towards normal levels. A marked response (61.97 %) of GSH was observed in the colonic mucosa pretreated with PEGS, as compared to mesalazine pretreatment (82.85 %). Moreover, our results clearly showed that the pretreatment with PEGS extract significantly (P <0.01) regulated the changes in glutathione metabolizing enzyme levels in the colonic mucosa by reversing (61.94 %) GPx and GST (59.17 %) levels, the efficacy of PEGS was comparable to that of mesalazine in restoring GPx (72.67 %) and GST (79.28 %) (Fig. 3b).

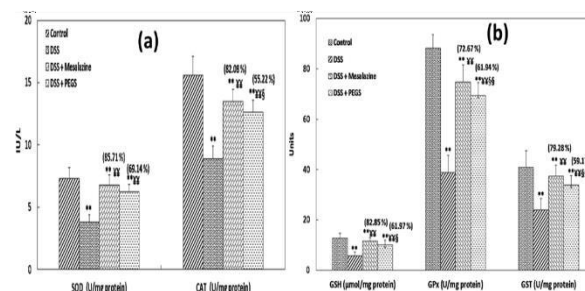


Fig 3. (a, b). The effect of PEGS on oxidative stress markers colonic mucosa ,SOD and CAT activities (a). Glutathione and Glutathione-metabolizing enzymes (b). Values are mean $\pm$ SD, (n = 10). (** p <0.01): DSS- group vs control groups; (* p <0.01): DSS group vs DSS + mesalazine; (§ p <0.01): DSS group vs DSS + PEGS). Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as: 100 x (values of DSS)-values of samples / (values of DSS)-values of control.

3.6. Effect of PEGS on in vivo nitrosative stress markers in the colonic mucosa of mice

As illustrated in Figure 4, levels of NO, S-nitrosothiol and peroxynitrite were found to be significantly (P <0.01) higher in the colonic mucosa of DSS -group, by about 8.65 fold for the NO and by about 9.01 fold for S-nitrosothiol and by about 2.02 for peroxynitrite when compared with normal mucosa. However, pretreatment with PEGS restored (69.18 %; 52.87 %; and 73.02 %) the NO, S-nitrosothiol and peroxynitrite levels respectively as compared to mesalazine (82.2 %; 70.89 % and 85.69 %,) respectively (Fig. 4).

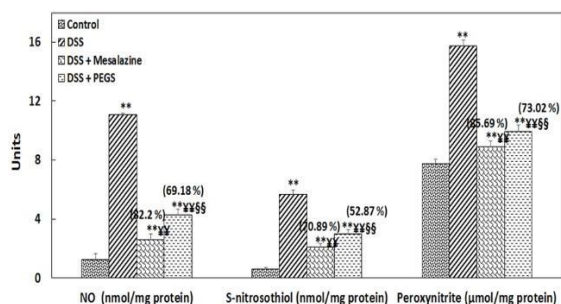


Fig 4. Effect of PEGS on nitrosative stress markers: NO, PON and RSNO levels in colonic mucosa. Values are mean $\pm$ SD, (n = 10). (** p < 0.01): DSS-group vs control groups; ($^{**}p$ < 0.01): DSS group vs DSS + mesalazine; ($^{§§}p$ < 0.01): DSS group vs DSS + PEGS). Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as: $100 \times (\text{values of DSS} - \text{values of samples}) / (\text{values of DSS} - \text{values of control})$.

3.7. Anti-inflammatory studies of PEGS

Pro-inflammatory cytokines in the colonic mucosa of mice

DSS significantly increases significantly (P < 0.01) the production of the pro-inflammatory cytokines in the distal colon such as TNF- α (3.17 fold) IL-6 (6.05 fold). However PEGS pretreatment significantly (P < 0.01) attenuated the levels of TNF- α (71.77 %) and IL-6 (79.79 %) as compared to mesalazine (88.04 %; 84.46 %) respectively (Fig. 5 a,b).

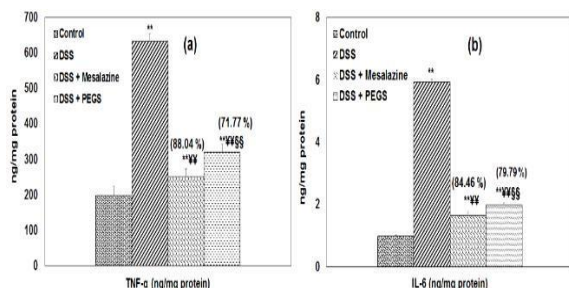


Fig 5 (a, b). Effect of PEGS Pro-inflammatory cytokines in the colonic mucosa of mice TNF- α (a), IL-6 (b). Values are mean $\pm$ SD, (n = 10). (** p < 0.01): DSS-group vs control groups; ($^{**}p$ < 0.01): DSS group vs DSS + mesalazine. ($^{§§}p$ < 0.01): DSS group vs DSS + PEGS). Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as: $100 \times (\text{values of DSS} - \text{values of samples}) / (\text{values of DSS} - \text{values of control})$.

MPO activity in colonic tissues

Massive PMN recruitment into the colonic tissue was further confirmed by increased MPO activity [Figure 6]. A significant (P < 0.01) increase was observed in MPO activity in colonic tissues of DSS- group (8.99 ± 0.3 U/mg protein) with respect to control tissues (3.6 ± 0.08 U/mg protein) [Figure 6]. Additionally, administration of PEGS significantly

(P < 0.01) normalized (67.9 %) the MPO level, in comparison to mesalazine (84.46 %) (Fig. 6).

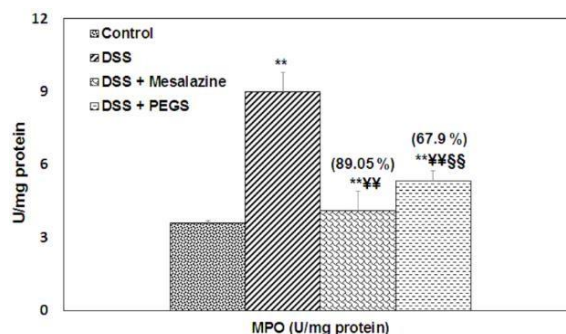


Figure 6. Effect of PEGS on MPO activity in colonic tissues. Values are mean $\pm$ SD, (n = 10), (** p < 0.01): DSS-group vs control groups; ($^{**}p$ < 0.01): DSS group vs DSS + mesalazine; ($^{§§}p$ < 0.01): DSS group vs DSS + PEGS). Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as: $100 \times (\text{values of DSS} - \text{values of samples}) / (\text{values of DSS} - \text{values of control})$.

In the present study an acute inflammation of colon was created during 7 days of administration of DSS administration to Swiss albino mice and followed by a slow regeneration of the colonic epithelium. This DSS-model exhibits symptoms similar to those of human ulcerative colitis [46] such as diarrhea, bloody feces, body weight loss, mucosal ulceration, and shortening of colon length. The DSS-induced colitis model has been shown to exhibit several characteristics found in humans, including inflammation that begins in the distal colon and then affects the proximal colon [47]. Many factors have been involved in the pathogenesis of UC. The overproduction of ROS and RNS through neutrophil recruitment which overwhelms the protective mechanisms of tissue antioxidants [48]. The colon is more susceptible to oxidative damage due to the relatively small amount of antioxidants attainable in the mucosa [49]. Evidence suggests that chronic intestinal inflammation correlates with increased production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) and the resulting oxidative stress and redox modulation by antioxidants [50].

In the present study, mice treated with DSS developed colonic damage that was observed as a substantial increase in the plasma LDH levels. The increased LDH activity can be attributed to cell membrane permeability dystrophy [51]. Our results also revealed that the DSS-model exhibits intense oxidative stress in the intestinal tissue, which is evidenced by the high level of lipid peroxidation, as well as by the deterioration of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system involved in the elimination of superoxide anions and peroxide, including superoxide dismutase, catalase, and the glutathione-dependent enzymes. The reduction of endogenous antioxidant defense system may promote

the free radical formation, breakdown of the GSH-dependent antioxidant defense system, and sequential alteration of cellular redox balance [52].

Our results are in agreement with those of Tahan [53], Spitzet [54], and Brito [23] mentioned that the PLS from red algae *Gracilaria birdiae* reduced mucosal lesions in colon tissues and decreased the inflammatory response in the colon, which is linked to a decrease in oxidative stress. Luo [55] reported that guava leaf polysaccharides improve the enzymatic defense system. Barros-Gomes [56] showed that sulfated polysaccharides from seaweed *Gracilaria birdiae*, increased cytosolic enzyme activities (glutathione reductase and catalase). It has been reported that the polysaccharides from algae *Gracilaria caudata* improved the antioxidant system [57]. According to Rocha de Souza [58] and Kim [59], the sulfated polysaccharides extracted from marine algae have prevented oxidative damage in living organisms. Another study also showed that mucosal damage was reduced by sulfated polysaccharides and by acting through the enhancement of endogenous antioxidants [24]. It has been reported that PLS decreased the mucosal damage in colon tissue and reduced the inflammatory response which is apparently related to decrease oxidative stress [23].

In our investigation, PEGS elevated the levels of glutathione metabolizing enzymes. These effects could be due to the antioxidant properties of PEGS which enhance the removal of ROS from the colon tissue system. Overexpression of the colonic glutathione antioxidant system in mice pretreated with PEGS suggests that this potent antioxidant defense may be reactivated by the PEGS. Indeed reports have revealed the effects of PLS on the glutathione system [60].

The possible antioxidant mechanism of action of PEGS includes its ability to scavenge reactive oxygen species or/and enhance endogenous antioxidants levels. In the present study, we also showed that lesions of the intestinal mucosa were accompanied by elevated levels of RNS. Special attention should be paid to RNS, which can be produced and issued by immune cells and play an important role in the pathophysiology of ulcerative colitis [61]. Recruitment and activation of neutrophils during acute inflammation contribute to the overproduction of ROS/RNS which overwhelms tissue antioxidant protective mechanisms, resulting in oxidative stress, which perpetuates inflammation of the colon [62][63]. The concept of nitrosative stress stems from the fact that interactions between nitrosants and oxidants can produce products that are more toxic than either reagent alone [64]. Under such conditions, nitrosylation can directly stimulate disadvantageous oxidative changes [65]. The results of the present study also revealed that nitrosative stress, S-nitrosothiols (NO donors), peroxynitrite (oxidant formed from NO

and superoxide anion (O_2^-), were higher in colon tissue of the DSS-group. A highly reactive species, peroxynitrite ($ONOO^-$), is formed as a result of the reaction of $NO^\bullet$ with O_2^- , and can oxidize and nitrate the genome [66]. Nitrosative stress can cause nitrosylation reactions which induce changes in the structure and function of proteins and stimulate lipid peroxidation [67].

Higher concentrations of oxidizing species can promote the conversion of NO to higher oxide forms, such as nitrogen dioxide and peroxynitrite ($ONOO^-$) which can lead to altered homeostasis of the redox state [68]. From our results it is clear that the PEGS pretreatment, significantly neutralizes the nitrosative stress induced by DSS. In addition, the present study reports that administration of DSS to Swiss albino mice resulted in an infiltration of neutrophils which are evidenced by a high level of myeloperoxidase activity that may exacerbate the colonic tissue damage with the most generation free-radicals.

In the present study, the intestinal mucosa damage induced by DSS was also accompanied by inflammatory responses which are evidenced by the elevated levels of $TNF-\alpha$ and IL-6.

Several studies have shown that the immune cells and intestinal epithelial cells secrete various types of pro-inflammatory cytokines such as $TNF-\alpha$, IL-1 β , and IL-6 in the colonic mucosa of UC patients [69] and may amplify the inflammatory cascade resulting in intestinal tissue damage in UC induced by DSS.

Several conventional drugs have been selected as a potent antioxidant and ROS scavengers for the treatment of UC in humans, such as 5-aminosalicylate (5-ASA) and the immunosuppressant [70] [71]. Unfortunately, these treatments are not devoid of potentially serious side effects, thus limiting their chronic use. It has been systematically reported in the literature that PLSs exhibit antioxidant activity, anti-inflammatory like those extracted from marine algae [72]. Consequently, there is a compelling demand for safe and effective therapeutic strategies for human IBD. This could be the case for several polysaccharides exhibiting several biological activities, mainly linked to their antioxidant and anti-inflammatory properties [73][74]. Interestingly, several studies suggest that blocking the cytokine overexpression pathway and reducing MPO activity may be used as an indicator of anti-inflammatory activity and may be useful in the treatment of UC [75]. Many drugs have been reported to decrease the severity of UC disease, including Adalimumab, a $TNF-\alpha$ blocker, which has been successfully used for the treatment of patients with IBD clinically, the anti- $TNF-\alpha$, infliximab, a mouse monoclonal antibody is also believed to have an effective therapeutic effect on UC in a clinical case [76][77]. Aminosalicylates

remain the cornerstone of treatment for patients with active, mild to moderate UC [78].

Corticosteroids also remain popular medications for inducing remission in UC disease. Sulfasalazine, mesalamine, and the steroids, glucocorticoids, also help reduce inflammation of the intestinal wall. However, their significant negative effect limits their long-term use [79]. Recently, natural products such as flavonoids and polysaccharides have shown great potential for inflammatory inhibition [80][81] via the modulation of the expression of pro-inflammatory genes, for example, nitric oxide synthase (NOS), and the generation of pro-inflammatory mediators comprising cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6

[82]. For these reasons, polysaccharides have become available for the treatment of Crohn's disease. The involvement of anti-inflammatory mechanisms of the PEGS have obviously been provided in this study. Our result also revealed that the PEGS treatment (60 mg/kg) reduced the activity of MPO as the index of inflammatory cells infiltration in colitis and modulated the inflammatory responses possibly by preserving the pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6) at values close to normal, suggesting that the protective effect of PEGS against colonic injury is also linked to the regulation of the pro-inflammatory cytokine.

4. Conclusions

This study concluded that PLS fraction extracted from the seaweed *Gelidium spinosum* (PEGS) has the protective effect against DSS-induced ulcerative colitis in male Swiss albino mice. The mechanisms contributing to its effectiveness may be the attenuating the clinical symptoms (disease activity index; DAI), reducing nitrosative and pro-inflammatory biomarkers (NO, S-nitrosothiol, peroxynitrite, TNF- α , IL-6, and MPO activity). These significant protective effects of PEGS were associated with a remarkable amelioration of the antioxidant defense system (SOD, CAT activities, the glutathione metabolizing enzyme glutathione) in the colon tissue. Therefore, further phytochemical and molecular investigations are needed to explain whether the PLSs a constituent may interfere with some molecular pathways of the UC protection.

5. Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest toward the publication of this article.

6. Formatting of funding sources

The project was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria. Grant n°: D01N01UN250120190002.

7. Acknowledgments

Authors thank Algerian government for financial support.

8. References

- [1] Kravchenko, A. O., Anastyuk, S. D., Isakov, V. V., Sokolova, E. V., Glazunov, V. P., & Yermak, I. M. (2014). Structural peculiarities of polysaccharide from sterile form of Far Eastern red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Carbohydrate polymers*, 111, 1-9.
- [2] Na, Y. S., Kim, W. J., Kim, S. M., Park, J. K., Lee, S. M., Kim, S. O., ... & Park, Y. I. (2010). Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. *International immunopharmacology*, 10(3), 364-370.
- [3] de Brito, T. V., Prudêncio, R. D. S., Sales, A. B., Vieira Júnior, F. D. C., Candeira, S. J. N., Franco, Á. X., ... & dos Reis Barbosa, A. L. (2013). Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(5), 724-733.
- [4] Akatsuka, I. S. A. M. U. (1986). Japanese Gelidiales (Rhodophyta), especially *Gelidium*. *Oceanogr. mar. biol. ann. Rev.*, 24, 171-263.
- [5] Boo, G. H., Park, J. K., Gerung, G. S., & Boo, S. M. (2013). Transfer of the red alga *Gelidium zollingeri* Sonder (Gelidiales) to *Yonagunia* (Halymeniales) based on morphological and molecular evidence. *Phycologia*, 52(3), 279-287.
- [6] Fan, K. C. (1961). Morphological studies of the Gelidiales. *Uni. Calif. Publ. Bot.*, 32, 315-368.
- [7] Lee, Y. P. (1988). Taxonomic studies on the Gelidiaceae (Rhodophyta) in Cheju Island 1. Some members of *Gelidium*. *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 18(2), 95-95.
- [8] Kim, K. M., Hwang, I. K., Yoon, H. S., & Boo, S. M. (2012). Four novel *Gelidium* species (Gelidiales, Rhodophyta) discovered in Korea: *G. coreanum*, *G. jejuensis*, *G. minimum* and *G. prostratum*. *Phycologia*, 51(4), 461-474.
- [9] Boo, G. H., Kim, K. M., Nelson, W. A., Riosmena-Rodríguez, R., Yoon, K. J., & Boo, S. M. (2014). Taxonomy and distribution of selected species of the agarophyte genus *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta). *Journal of applied phycology*, 26(2), 1243-1251.
- [10] Kamenarska, Z., Serkedjieva, J., Najdenski, H., Stefanov, K., Tsvetkova, I., Dimitrova-Konaklieva, S., & Popov, S. (2009). Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea.
- [11] Poulse, N., Sajayan, A., Ravindran, A., Sreechithra, T. V., Vardhan, V., Selvin, J., & Kiran, G. S. (2020). Photoprotective effect of nanomelanin-seaweed concentrate in formulated

cosmetic cream: With improved antioxidant and wound healing properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 205, 111816.

- [12] Du, L., & Ha, C. (2020). Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis. *Gastroenterology Clinics*, 49(4), 643-654.
- [13] Lichtenstein, G. R., Abreu, M. T., Cohen, R., & Tremaine, W. (2006). American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 130(3), 940-987.
- [14] Pedersen, J., Coskun, M., Soendergaard, C., Salem, M., & Nielsen, O. H. (2014). Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(1), 64.
- [15] Valatas, V., Vakas, M., & Kolios, G. (2013). The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(11), G763-G785.
- [16] Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay- Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)- induced colitis in mice. *Current protocols in immunology*, 104(1), 15-25.
- [17] Taylor, K. M., & Irving, P. M. (2011). Optimization of conventional therapy in patients with IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 8(11), 646-656.
- [18] Sales-Campos, H., Basso, P. J., Alves, V. B. F., Fonseca, M. T. C., Bonfá, G., Nardini, V., & Cardoso, C. R. B. (2014). Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48, 96-107.
- [19] Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., & Zhang, Q. (2010). Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 118-121.
- [20] Jonsson, M., Jestoi, M., Nathanail, A. V., Kokkonen, U. M., Anttila, M., Koivisto, P., ... & Peltonen, K. (2013). Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. *Food and chemical toxicology*, 53, 27-32.
- [21] Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British journal of pharmacology*, 160(7), 1577-1579.
- [22] Jädert, C., Phillipson, M., Holm, L., Lundberg, J. O., & Borniquel, S. (2014). Preventive and therapeutic effects of nitrite supplementation in

experimental inflammatory bowel disease. *Redox biology*, 2, 73-81.

- [23] Brito, T. V., Neto, J. P., Prudêncio, R. S., Batista, J. A., Júnior, J. S., Silva, R. O., ... & Barbosa, A. L. (2014). Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8), 1161-1170.
- [24] Brito, T. V., Barros, F. C., Silva, R. O., Júnior, G. J. D., Júnior, J. S. C., Franco, Á. X., ... & Barbosa, A. L. R. (2016). Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. *Carbohydrate polymers*, 151, 957-964.
- [25] Lyakhovich, A., & Gasche, C. (2010). Systematic review: molecular chemoprevention of colorectal malignancy by mesalazine. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 31(2), 202-209.
- [26] Lee, M. J., Park, W. H., Song, Y. S., Lee, Y. W., Song, Y. O., & Moon, G. S. (2008). Effect of bamboo culm extract on oxidative stress and genetic expression: bamboo culm extract ameliorates cell adhesion molecule expression and NFκB activity through the suppression of the oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 27(5), 755-763.
- [27] Kornberg, A. (1955). Lactate dehydrogenase of muscle. *Meth Enzymol*, 1, 441-444.
- [28] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- [29] Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- [30] Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47(3), 469-474.
- [31] Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- [32] Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.
- [33] Sedlak, J. (1982). Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. *Endocrinologia experimentalis*, 16(2), 103-109.
- [34] Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- [35] Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., & Hoekstra, W.

- (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179(4073), 588-590.
- [36] Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., & Fein, H. (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*, 3(8), 276-284.
- [37] Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free radical biology and medicine*, 43(5), 645-657.
- [38] Cortas, N. K., & Wakid, N. W. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clinical chemistry*, 36(8), 1440-1443.
- [39] Wink, D. A., Kim, S., Coffin, D., Cook, J. C., Vodovotz, Y., Chistodoulou, D., ... & Grisham, M. B. (1999). [21] Detection of S-nitrosothiols by fluorometric and colorimetric methods. *Methods in enzymology*, 301, 201-211.
- [40] Beckman, J. S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., ... & Tsai, M. (1992). Kinetics of superoxide dismutase-and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics*, 298(2), 438-445.
- [41] Neubrand, V. E., Pedreño, M., Caro, M., Forte-Lago, I., Delgado, M., & Gonzalez- Rey, E. (2014). Mesenchymal stem cells induce the ramification of microglia via the small RhoGTPases Cdc42 and Rac1. *Glia*, 62(12), 1932-1942.
- [42] Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, 78(3), 206-209.
- [43] Khatulistiwa, T. S., Noviendri, D., Munifah, I., & Melanie, S. (2020). Bioactivities of red seaweed extracts from Banten, Indonesia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 404, No. 1, p. 012065). IOP Publishing.
- [44] Croce, M. E., Villar, M. A., & Parodi, E. R. (2015). Assessment of alternative sources of seaweed polysaccharides in Argentina: potentials of the agarophyte *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Gaillon (Rhodophyta, Gelidiales). *Journal of applied phycology*, 27(5), 2099-2110.
- [45] Mollion, J., Andriantsiferana, M., & Sekkal, M. (1990). A study of the phycocolloids from *Gelidium madagascariense* and *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) collected on the south coasts of Madagascar. *Hydrobiologia*, 204(1), 655-659.
- [46] Kwon, H. S., Oh, S. M., & Kim, J. K. (2008). Glabridin, a functional compound of liquorice, attenuates colonic inflammation in mice with dextran sulphate sodium- induced colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 151(1), 165-173.
- [47] Axelsson, L. G., Landström, E., Goldschmidt, T. J., Grönberg, A., & Bylund-Fellenius, A. C. (1996). Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4+-cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflammation Research*, 45(4), 181-191.
- [48] Piechota-Polanczyk, A., & Fichna, J. (2014). The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(7), 605-620.
- [49] Pravda, J. (2005). Radical induction theory of ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(16), 2371.
- [50] Balmus, I. M., Ciobica, A., Trifan, A., & Stanciu, C. (2016). The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in inflammatory bowel disease: clinical aspects and animal models. *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 22(1), 3.
- [51] Shtukmaster, S., Ljubuncic, P., & Bomzon, A. (2010). The effect of an aqueous extract of *Teucrium polium* on glutathione homeostasis in vitro: a possible mechanism of its hepatoprotectant action. *Advances in pharmacological sciences*, 2010.
- [52] Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. C., & Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 277S-283S.
- [53] Tahan, G., Gramignoli, R., Marongiu, F., Aktolga, S., Cetinkaya, A., Tahan, V., & Dorko, K. (2011). Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*, 56(3), 715-720.
- [54] Spitz, D. R., Azzam, E. I., Li, J. J., & Gius, D. (2004). Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23(3), 311-322.
- [55] Luo, Y., Peng, B., Wei, W., Tian, X., & Wu, Z. (2019). Antioxidant and anti-diabetic activities of polysaccharides from guava leaves. *Molecules*, 24(7), 1343.
- [56] Barros-Gomes, J. A. C., Nascimento, D. L. A., Silveira, A. C. R., Silva, R. K., Gomes, D. L., Melo, K. R. T., ... & Rocha, H. A. O. (2018). In Vivo evaluation of the antioxidant activity and protective action of the seaweed *Gracilaria Birdiae*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.

- [57] Alencar, P. O. C., Lima, G. C., Barros, F. C. N., Costa, L. E., Ribeiro, C. V. P., Sousa, W. M., ... & Freitas, A. L. P. (2019). A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: In vitro and in vivo activities. *Food Hydrocolloids*, 90, 28-34.
- [58] de Souza, M. C. R., Marques, C. T., Dore, C. M. G., da Silva, F. R. F., Rocha, H. A. O., & Leite, E. L. (2007). Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of applied phycology*, 19(2), 153-160.
- [59] Choi, D. S., Athukorala, Y., Jeon, Y. J., Senevirathne, M., Cho, K. R., & Kim, S. H. (2007). Antioxidant activity of sulfated polysaccharides isolated from *Sargassum fulvellum*. *Preventive Nutrition and Food Science*, 12(2), 65-73.
- [60] Kim, J. H., Lee, J. E., Kim, K. H., & Kang, N. J. (2018). Beneficial effects of marine algae-derived carbohydrates for skin health. *Marine drugs*, 16(11), 459.
- [61] Martin-Subero, M., Anderson, G., Kanchanatawan, B., Berk, M., & Maes, M. (2016). Comorbidity between depression and inflammatory bowel disease explained by immune-inflammatory, oxidative, and nitrosative stress; tryptophan catabolite; and gut-brain pathways. *CNS spectrums*, 21(2), 184-198.
- [62] Achitei, D., Ciobica, A., Balan, G., Gologan, E., Stanciu, C., & Stefanescu, G. (2013). Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients. *Digestive diseases and sciences*, 58(5), 1244-1249.
- [63] Zhou, G. X., & Liu, Z. J. (2017). Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease. *Journal of digestive diseases*, 18(9), 495-503.
- [64] Eu, J. P., Liu, L., Zeng, M., & Stamler, J. S. (2000). An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry*, 39(5), 1040-1047.
- [65] Simon, D. I., Mullins, M. E., Jia, L., Gaston, B., Singel, D. J., & Stamler, J. S. (1996). Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 4736-4741.
- [66] Marshall, H. E., Merchant, K., & Stamler, J. S. (2000). Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *The FASEB Journal*, 14(13), 1889-1900.
- [67] Haklar, G., Sayin-Özveri, E., Yüksel, M., Aktan, A. Ö., & Yalçın, A. S. (2001). Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer letters*, 165(2), 219-224.
- [68] Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., & Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(5), 463-488.
- [69] Bouguen, G., Chevaux, J. B., & Peyrin-Biroulet, L. (2011). Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(5), 547.
- [70] Andrews, J. M., Travis, S. P., Gibson, P. R., & Gasche, C. (2009). Systematic review: does concurrent therapy with 5-ASA and immunomodulators in inflammatory bowel disease improve outcomes?. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 29(5), 459-469.
- [71] Jean, L., Audrey, M., & Beauchemin, C. (2018). Economic evaluations of treatments for inflammatory bowel diseases: A literature review. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018.
- [72] Zhong, Q., Wei, B., Wang, S., Ke, S., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2019). The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview. *Marine drugs*, 17(12), 674.
- [73] Zhao, C., Wu, Y., Yang, C., Liu, B., & Huang, Y. (2015). Hypotensive, hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of bioactive compounds from microalgae and marine micro-organisms. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(8), 1705-1717.
- [74] Lima, R. L., Pires-Cavalcante, K. M. D. S., Alencar, D. B., Viana, F. A., Sampaio, A. H., & Saker-Sampaio, S. (2016). In vitro evaluation of antioxidant activity of methanolic extracts obtained from seaweeds endemic to the coast of Ceará, Brazil. *Acta Scientiarum. Technology*, 38(2), 247-255.
- [75] Wéra, O., Lancellotti, P., & Oury, C. (2016). The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *Journal of clinical medicine*, 5(12), 118.
- [76] Billmeier, U., Dieterich, W., Neurath, M. F., & Atreya, R. (2016). Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*, 22(42), 9300.
- [77] Rawla, P., Sunkara, T., & Raj, J. P. (2018). Role of biologics and biosimilars in inflammatory bowel disease: current trends and future perspectives. *Journal of inflammation research*, 11, 215.
- [78] Feagan, B. G., & MacDonald, J. K. (2012). Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane database of systematic reviews*, (10).
- [79] Ham, M., & Moss, A. C. (2012). Mesalamine in the treatment and maintenance of remission of ulcerative colitis. *Expert review of clinical pharmacology*, 5(2), 113-123.

-
- [80] Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P. T., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., ... & De Simone, A. (2017). Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science*, 358(6369), 1440-1443.
- [81] Li, M., van Esch, B. C., Wagenaar, G. T., Garssen, J., Folkerts, G., & Henricks, P. A. (2018). Pro-and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *European journal of pharmacology*, 831, 52-59.
- [82] Carvalho, G. B., Drago, I., Hoxha, S., Yamada, R., Mahneva, O., Bruce, K. D., ... & William, W. J. (2017). The 4E-BP growth pathway regulates the effect of ambient temperature on *Drosophila* metabolism and lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), 9737- 9742.