CARACTERISATION PARTIELLE DES POLYSACCHARIDES HYDROSOLUBLES DES GOMMES RESINES DE *Ferula communis* L. (APIACEAE): ACTIVITES BIOLOGIQUES

YOUMBAI Asma[1], MEHELLOU Zineb[1], BOUAL Zakaria[1], MICHAUD Philippe [2], et OULD EL HADJ Mohammed Didi[1]

(1)Université de Ouargla, Laboratoire Protection des écosystèmes en zones arides et semi-arides, 30000 Ouargla, Algérie

(2)Université Clermont-Auvergne, Institut Blaise Pascal, UMR CNRS 6602 CNRS Polytech Clermont-Ferrand, Aubière, France

youmbaiasma@yahoo.fr

Résumé.- *L'étude des polysaccharides hydrosolubles des gommes résines de* Ferula communis *L., plante spontanée de la famille des Apiaceae du Sahara septentrional Algérien, a permis d'isoler par macération une fraction polysaccharidique hydrosoluble (FC). Les gommes résines séchées sont traitées à l'éther de pétrole. Après une filtration, le résidu séché à température ordinaire est macéré à l'eau distillée. L'addition à cet extrait d'isopropanol à 95% précipite les polysaccharides. Le rendement massique est de 43.08%. L'étude de la composition chimique des extraits bruts, laisse apparaître des taux d'oses totaux de 72.6%. Les oses neutres ont les teneurs les plus élevées avec 60.45%. Les teneurs en protéines sont de 2.67%. L'analyse de la composition en monosaccharides par CCM après une hydrolyse par TFA (2M) durant 4 heures et 6 heures à 100 °C montre la présence d'arabinose, et de galactose. La mesure de TCA de l'activité anticoagulante présente une valeur de 29.4s qui est inférieure à celle du contrôle normal 30.9 s. La fraction FC a une activité phagocytaire de 6%. Toutefois, le zymosan utilisé comme contrôle positif présente une activité de 18%.*

Mots clés: *Polysaccharides, plante spontanée, Apiaceae, activité biologique, Sahara.*

PARTIAL CARACTERIZATION OF THE WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES OF *Ferula communis* L. GUMS (APIACEAE) : BIOLOGICALS ACTIVITIES.

Abstract.- *The study Crude water-soluble polysaccharides were extracted from the* Ferula communis *L. gums; species of Apiaceae family, from the region of Septentrional Algerian Sahara helped by maceration isolate a water-soluble polysaccharide fraction (FC). These polysaccharides were obtained by elimination of the petroleum ether extract and sequential extraction in distilled water, followed by precipitation in 95% isopropanol. The yield of extract is of 43.08%. The study of the chemical composition of crude extracts, reveals total saccharide rate of 72.6% .The neutral monosaccharides have the highest levels with 60.45%. Protein levels are 2.67%. The analysis of monosaccharides composition by TLC after hydrolysis by 2 M TFA for 4 hours and 6 hours at 100 ° C shows the presence of galactose and arabinose. The measurement of the APTT anticoagulant activity provides for the fraction FC 29.4 s. This value is lower than that of the normal control 30.9 s. Fraction FC has an phagocytic activity of 6% f. However, zymosan used as positive control has an activity of 18%.*

Key words*: Polysaccharides, spontaneous plants, Apiaceae, biological activity, Sahara.*

Introduction

Le genre Ferula comporte près de 180 espèces poussant à travers le Monde, principalement dans les régions arides. Cent trente espèces sont communes au bassin méditerranéen et à l'Asie centrale [1]. De nombreuses espèces du genre Ferula sont connues depuis l'antiquité en tant que sources de gommes-oléorésines (des sécrétions obtenues par entailles répétées de la partie supérieure des racines) surtout le galbanum et l'ase fétide [2]. Le *F. communis* très gommifère, la gomme qui suinte de la férule à la suite de la piqûre d'un charançon est signalée par d'autres auteurs sous le nom de «résine» ou «gomme résine» [3]. Cette espèce se développe dans une ambiance bioclimatique sub-humide inférieure à semi-aride supérieure (Algérie) [4].

Des polysaccharides des gommes oléorésines extrait par des solutions alcooliques font l'objet de quelques études scientifiques. Des chercheurs ont identifié la composition des gommes par des méthodes chimiques.

Face à ce constat, la présente étude recherche les polysaccharides hydrosolubles d'une plante spontanée du Sahara Algérien du genre Ferula. Il s'agit de *Ferula communis L.*. L'étude porte sur la caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des gommes résines et de tester leur effet sur la cascade de la coagulation du sang, et d'évaluer l'activité phagocytaire en présence des polysaccharides obtenus.

1.- Matériels et méthodes

1.1.- Matériel végétal

Les gommes de *F. communis* sont récoltées en été 2014 dans la région de Bechar puis, transportées au laboratoire pour analyse dans des sacs en papier kraft où sont notées toutes les informations concernant la plante [5].

1.2.- Extraction des polysaccharides

Trente (30) grammes de poudre sont prétraités par l'éther de pétrole [6] pour éliminer les lipides pendant 5 heures à la température ambiante avec une agitation constante et douce. Les résidus sont séchés après filtration à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les gommes résines ainsi séchées sont macérées dans l'eau distillée [7] pendant 2 heures à 80°C et sous agitation constante. L'extraction est répétée trois fois. Après une centrifugation à 4000 rpm pendant 15mn [8], les trois surnageant sont réunis et concentrés. Les polysaccharides de l'extrait concentré, sont précipités à l'aide de 3 volumes d'Isopropanol (95%) [9,10] pendant 24 heures à 4°C. Après une centrifugation à 4000rpm pendant 15mn, le culot est récupéré puis lavé trois fois par l'acétone [11] et lyophilisé pendant 24 heures. Le lyophilisat représente l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles.

Tel/Fax : (+213) 029 71 56 89 e-mail : polysac2017@gmail.com

1.3.- Composition de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles

Le dosage des oses constitutifs des polysaccharides repose sur la réaction des dérivés sulfuriques obtenus par action à chaud, d'un acide concentré comme l'acide sulfurique (H2SO4), pour divers composés aromatiques, tels que le phénol pour le dosage des oses totaux [12]. Le résorcinol pour le dosage des oses neutres [13], et le méta-hydroxydiphényle pour le dosage des acides uroniques [14]. La concentration en oses neutres et en oses totaux est obtenue par référence à une gamme étalon de glucose et celle des oses acides avec une gamme étalon d'acide glucuronique [13]. La teneur en protéines est déterminée par la méthode de BRADFORD (1976) [15]. La concentration en protéines est obtenue par référence avec une gamme étalon de sérum albumine bovine, après coloration au bleu de Coomassie [16].

1.4.- Caractérisation qualitative des résidus glycosidiques

Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse [17].

1.4.1.- Hydrolyse acide des liaisons glycosidiques

Vingt cinq (25) milligrammes de chaque extrait brut de polysaccharides hydrosolubles lyophilisé sont hydrolysés par 1ml d'acide trifluoroacétique 2M, à 100°C pendant 4 heures et 6 heures, dans des tubes fermés. Après refroidissement, l'hydrolysat est récupéré. L'acide est co-évaporé par l'ajout de quelques gouttes de méthanol. Les hydrolysats sont déposés dans un dessiccateur sous hotte pendant 24 heures jusqu'à évaporation complète [18].

1.4.2.- Chromatographie sur couche mince des résidus glycosidiques

Pour la présente étude, il sera utilisé différents étalons oses que peuvent renfermer les polysaccharides. Il s'agit du galactose, de l'arabinose, du glucose, de xylose, du mannose, et d'acide glucuronique [19]. La phase mobile est constituée d'acétate d'éthyle-méthanol-n-butanol- eau dans les proportions de 16:3:3:1pour le premier système, et de chloroforme-n-butanol-méthanol-eau-acide acétique, dans les proportions de 4,5:12,5:5:1,5:1,5 pour le deuxième système. La phase stationnaire, des plaques en gel de silice de type Silica gel 60 F 254 de 0,25mm d'épaisseur sur feuille d'aluminium, sont utilisées [20]. Le réactif de Nigrum est utilisé comme révélateur des spots [21].

1.5.- Activité biologique

1.5.1- Activité anticoagulante

L'effet des polysaccharides hydrosolubles sur la coagulation du sang, est évalué par un test de coagulation qui est le temps de céphaline activée (TCA) à l'aide d'un coagulomètre. Le plasma utilisé est obtenu à partir du sang de sujets sains (25-45ans). Le prélèvement est fait par ponction veineuse. Le sang est mélangé au citrate tri-sodique

Tel/Fax : (+213) 029 71 56 89 e-mail : polysac2017@gmail.com

(3,8%) et centrifugé (2400 g/mn, 20 mn) pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le plasma citraté est recueilli et stocké à -80°C jusqu'à utilisation [22].

Mesure du temps de céphaline activée (TCA)

A 90µl de plasma humain normal citraté sont ajoutés 10µl de solution polysaccharidique, puis 100µl de réactif de TCA est ajouté. Le mélange est incubé 5mn à 37°C. Après l'ajout de 100µl de $CaCl_2$ (0.025 mol/l), le temps de céphaline (kaolin) activée est enregistré [23].

1.5.2.- Activité phagocytaire *in vitro*

Quarante (40) microlitres d'extraits polysaccharidiques sont mélangés avec 200 µl du sang hépariné et incubé dans un bain Marie fermé avec agitation (60 rpm) à 37°C pendant 30 mn. Pour arrêter la réaction, les tubes sont mis sur la glace [24]. Les cellules stimulées sont lavées deux fois par le PBS [25] à 4°C et centrifugées à 250 g pendant 5mn. Quarante (40) microlitres de solution de levures *C. albicans* sont ajoutés au mélange des échantillons à 0°C. Les échantillons sont incubés dans un bain Marie avec agitation à 37°C pendant 10 mn. Tandis que, pour le contrôle négatif les échantillons sont placés sur la glace [24]. Après incubation, la phagocytose est arrêtée par l'addition de 2ml de PBS refroidi et les cellules sont ensuite lavées trois fois du PBS froid [26]. Les levures extracellulaires sont éliminées par centrifugation à 100g, pendant 5mn à 4°C [27]. Le teste de phagocytose se fait par l'évaluation de l'activité phagocytaire des *C. albicans* par les macrophages *in vitro.* Les cellules phagocytaires isolées a partir du sang qui sont des leucocytes stimulés par des particules opsonisées; zymosan (contrôle positif). L'activité phagocytaire des polysaccharides et celle du contrôle positif sont calculées selon [28], l'activité phagocytaire est représentée comme suit : PA% = CP test %- CP blanc%.

Une centaine de cellules adhérentes sont comptées pour déterminer le pourcentage de la phagocytose à l'aide d'un microscope optique (G:10×100). Les valeurs de phagocytoses représentent le pourcentage de cellules qui contiennent des particules de zymosans ou de levures intériorisées [29, 30, 31]. La capacité phagocytaire est représentée comme suit:

CP% = (nombre des cellules ingérées/ nombre totale) x 100%

2.- Résultats et discussion

2.1.- Caractérisations de l'extrait brut de polysaccharides

Il apparait que le rendement massique des polysaccharides hydrosolubles des gommes-résines de *F. communis* est de 43.08%. Le rendement est plus élevé que celui obtenu pour les gommes de *Ferula gumosa* Boiss qui est de 5% [32]. Par contre il est inférieur au rendement massique obtenu à partir des gommes oléorésines de *Ferula gummosa* qui est de 67% [33].

Tel/Fax : (+213) 029 71 56 89 e-mail : polysac2017@gmail.com

Toutefois, les résultats des analyses physico-chimiques de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles des gommes-résines de *F. communis*, montrent des valeurs de 2.67 % de protéines totales et 72.60 % d'oses totaux. Parmi les oses, 60.45% sont des oses neutres et 14.22% sont des oses acides (tableau I). Le rapport des pourcentages [oses acides] / [oses neutres] pour l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des inflorescences gommes-résines de *F. communis* est de 20%.

Tableau I.- Composition de l'extrait brut de polysaccharides

Teneur en oses (%)			Protéines (%)
Totaux	Neutres	Acides	
72.60	60.45	14.22	2.67

Au vu de tableau II, et les figure 1et 2 de CCM le polysaccharide hydrosoluble des gommes-résines de *F. communis* est constitué d'arabinose, et de galactose avec une dominance des taches de galactose donc peut être un polysaccharide de type arabinogalactanes.

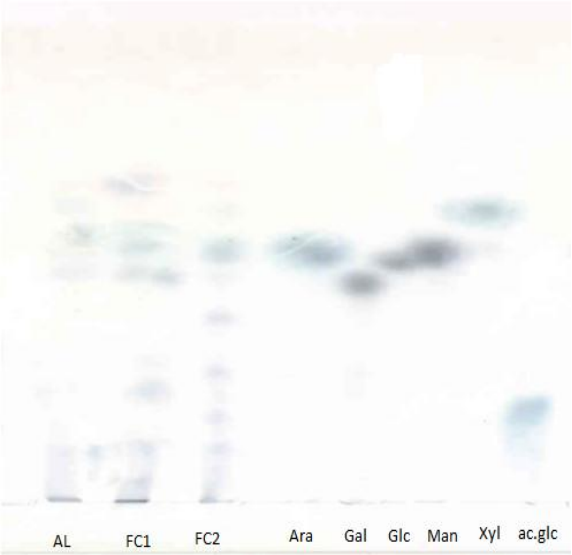

Figure1.- Chromatogramme de premier système

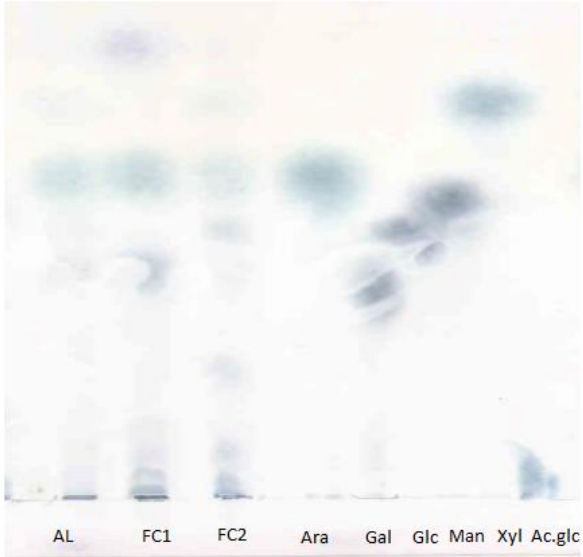

Figure2.- Chromatogramme de deuxième système

Tableau II.- Composition en monosaccharides de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles des gommes résines de F. communis dans les deux systèmes de CCM (Ara : arabinose, Gal : galactose, Glc : glucose, Man : mannose, Xyl : xylose, Ac.gluc : acide glucuronique)

		Système 1						Système 2					
	Fractions/ Etalons	Ara	Gal	Glc	Man	Xyl	Ac.gluc	Ara	Gal	Glc	Man	Xyl	Ac.gluc
TFA(2M/ 4h)	FC	×	×					×	×				
TFA(2M /6h)	FC	×	×						×				

Tel/Fax : (+213) 029 71 56 89 e-mail : polysac2017@gmail.com

2.2.- Activité anticoagulante

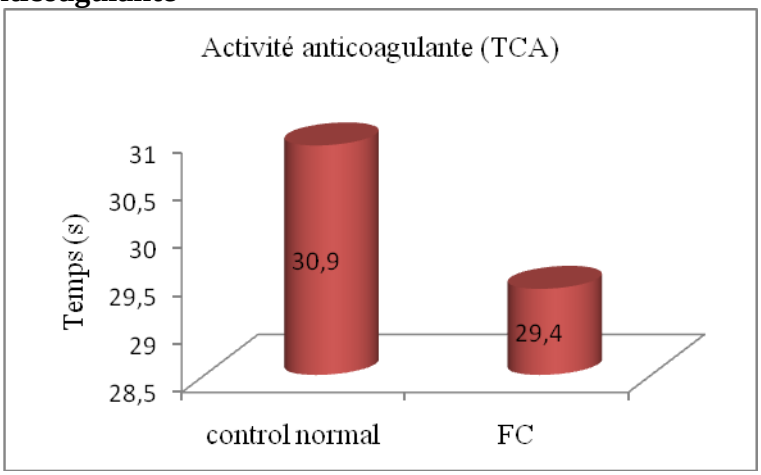

Figure 3.- Temps (seconde) de céphaline activée (TCA) de la fraction FC pour une concentration de 100 µg/10µl

D'après la figure 3 La valeur de TCA remarqué est de 29.4s. L'étude *in vitro* de l'activité anticoagulante de la fraction FC montre que la fraction n'a aucun effet sur la voie endogène de la coagulation dans le test TCA par rapport au contrôle normal 30.9 s. Un temps de coagulation des plasmas contenant 25 µg/ml de l'héparine 115s (TCA) est enregistré par [34].

2.3.- Activité phagocytaire

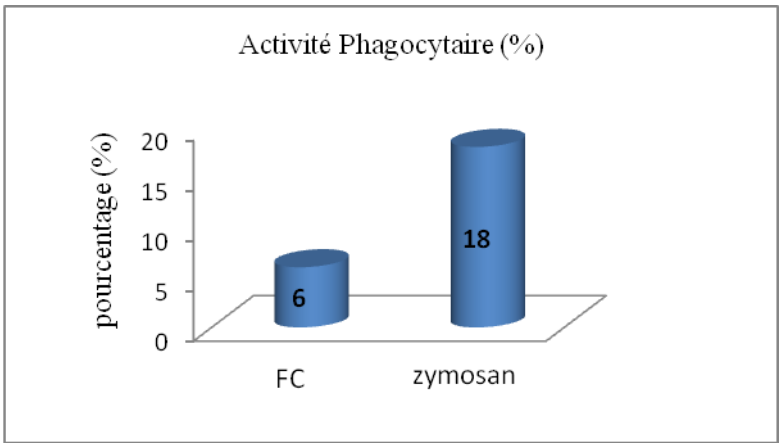

Figure 4.- Activité phagocytaire de la fraction polysaccharidique FC

La figure 4 présente la valeur de l'activité phagocytaire des extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles de la fraction obtenue FC. Elle est de 6% inférieure à celle obtenue par le zymosan 18%. Ce résultat montre que la fraction pourrait sensiblement améliorer la phagocytose des macrophages par la liaison des polysaccharides avec un récepteur spécifique à la surface des macrophages [35].

Tel/Fax : (+213) 029 71 56 89 e-mail : polysac2017@gmail.com

Conclusion

L'étude de la composition de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles des gommes résines de *Ferula communis* révèle la prédominance des oses neutres. L'analyse des polysaccharides hydrosolubles montre une hétérogénéité et une diversité d'oses; on trouve, en fait, les oses neutres et acides (pentoses et hexoses). Ils sont constitués principalement d'arabinose, et de galactose. La fraction FC ne prolonge pas le temps de la coagulation mais, elle accélère un peu le temps de coagulation donc elle a peut être l'effet inverse.

Références bibliographiques

[1].- Pimenov M. G., et Leonov M. V., 2004.- The Asian Apiaceae biodiversity database (ASIUM) with particular reference to south-west Asian taxa Turk. J. Bot., vol. 28:139-145.

[2]. - Alkhatib R. 2010. - Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris*Korovin et *Ferula lycia*Boiss (Apiacees). Chemical Sciences. Université du Droit et de la Santé - Lille II, France 233p.

[3]. - Hammiche V., Merad R., Azzouz M., 2013.- Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen Collection Phytothérapie pratique: 123-127.

[4].- Bouazza M., Mahboubi A., Loisel R., Benabadji N., 2001.- Bilan de la flore de la région de Tlemcen (Oranie-Algérie). Foret méditerranéenne T.XXII, vol.2: 130-136.

[5]. - Ozenda P., 1977. - Flore du Sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, 15, quai Anatole-France, Paris: 360-361.

[6].- Wang M., Jiang C., Ma L., Zhang Z., Cao L., Liu J., Zeng X., 2013.-Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hoveniadulcis*. Food Chemistry, vol.138 (1): 41–47.

[7].- Chidouh A., Aouadi S., Heyraud A., 2014.- Extraction, fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. Food Hydrocolloids, vol.35: 733-739.

[8].- Chen Z. G., Zhang D. N., Zhu Q., Yang Q. H., Han Y. B., 2014.-Purification, preliminary characterization and in vitro immunomodulatory activity of tiger lily polysaccharide. Carbohydrate Polymers, vol.106: 217–222.

[9].- Ibanez M. C. et Ferrero C., 2003.- Extraction and characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC seeds. Food Research International, vol. 36: 455 – 460.

Tel/Fax : (+213) 029 71 56 89 e-mail : polysac2017@gmail.com

[10].- Boual Z., Pierre G., Delattre C., Benaoun F., Petit E., Gardarin C., Michaud P., Ould Elhadj M. D., 2015.- Mediterranean semi-arid plant *Astragalus armatus* as a source of bioactive galactomannan. Bioactive Carbohydrate and Dietary Fibre, vol.5:10-18.

[11].- Yan H., Zhu D., Xu D., Wu J., Bian X., 2008.- A study on Cordycepsmilitaris polysaccharide purification, composition and activity analysis. African Journal of Biotechnology, vol: 7: 4004-4009.

[12].- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. D., Rebers P. A., Smith F., 1956.- Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chern., vol. 28: 350-356.

[13].- Monsigny M., Petit C., et Roche A.C., 1988.- Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acids micromethod. Analytical biochemistry, vol. 175: 525-530.

[14].- Blumenkrantz N., et Asboe-Hansen G., 1973.- New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical biochemistry, vol. 54: 484 - 489.

[15].- Bradford M.M., 1976.- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding Analytical biochemistry vol.72: 248-254.

[16].- Autran J. C., 1991.- Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Ed. Tec et Doc, Paris: 115-137.

[17].- Ruiz G., 2005.- Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat, 'université de Limoges, 230p.

[18].- Athukorala Y., Jung W. K., Vasanthan T., et Jean Y. J., 2006.- An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of Ecklonia cava. Carbohydrate Polymers, vol. 66: 184–191.

[19].- Doat, J. 1974. Application de la chromatographie sur couche mince à l'analyse des gommes et des bois tropicaux. *Revue Bois et Forêts Tropiques*, 156: 63-74.

[20].- Ghebregzabeier M., Rufini S., Monaldi B. Lato M., 1976.- Thin,Layer chromatography of carbohydrates. Journal of Chromatography, vol.127: 133-162.

[21].- Paulsen B. S., Olafsdottir E. S., et Ingolfsdottir K., 2002.- Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. Journal of chromatography, vol. 967: 163-171.

[22].- Zhang Y., Zhang J., Mo X., Lu X., Zhang Y. and Qin L., 2010.- Modification,

Tel/Fax : (+213) 029 71 56 89 e-mail : polysac2017@gmail.com

characterization and structure–anticoagulant activity relationships of persimmon polysaccharides. Carbohydrate Polymers, vol. 82: 515–520.

[23].- Wang X., Zhang Z., Yao Z., Zhao M., Qi H., 2013.- Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorphalinza*. International Journal of Biological Macromolecules, vol.58: 225-230.

[24].- Harun N. H., Septama A. W., et Jantan I., 2015.- Immunomodulatory effects of selected Malaysian plants on the CD18/11a expression and phagocytosis activities of leukocytes. Asian Pac J Trop Biomed, vol. 5(1): 48-53.

[25].- Chen R., Li H., Li S., Jin C., et Lu J., 2015.- Extraction optimization, preliminary characterization and immunological activity of polysaccharides from figs. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 72: 185–194.

[26].- Chena M. L., Wu S., Tsai T. C., Wang L. K., Tsai F. M., 2014.- Regulation of neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli* by antipsychotic drug. International Immunopharmacology, vol. 23: 550–557.

[27].- Czuprynski C. J., Noel E. J., et Adlam C., 1991.- Interaction of bovine alveolar macrophages with PasteurellahaemolyticaA1 in vitro: modulation by purified capsular polysaccharide. Veterinary microbiology, vol. 26: 349-358.

[28].- Steven M. M., Lennie S. E., Sturrock R. D., Gemmell C. G., 1984.- Enhanced bacterial phagocytosis by peripheral blood monocytes in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 43: 435-439.

[29].- Popov S. V., Popova C. Y., Ovodova R. G., Bushneva O. A., Ovodov Y. S., 1999.- Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. International Journal of Immunopharmacology, vol. 21: 617-624.

[30].- Nose M., Terawaki K., and Ogihara Y., 1997.- The role of a crude polysaccharide fraction in the macrophage activation by "Shosaikoto". Phytomedicine, vol. 4 (1): 23- 26.

[31].- Abid S., Khajuria A., Paravaiz Q., Sidiq T., Bhatia A., Singh S., Ahmad S., Randhawa M.K., Satti N. K., Prahbu Dutt P., 2012.- Immunomodulatory studies of a bioactive fraction from the fruit of *Prunuscerasus* in BALB/c mice. International Immunopharmacology, vol.12: 626–634.

[32].- Mohammadzadeh Milani J. M., Emam-Djomeh Z., Safari M., Mousavi M., Ganbarzadeh B., Philips Glyn O., 2007.- Physicochemical and Emulsifying Properties of Barijeh (*Ferula gumosa*) Gum. Iran. J. Chem. Chem. Eng, vol. 26 (3): 81-88.

[33].- Jalali H. T., Ebrahimianb Z. J., Evtuguinb D. V., Neto C. P., 2011.- Chemical

composition of oleo-gum-resin from *Ferula gummosa*.Industrial Crops and Products, vol.33: 549–553.

[34].- Ticar B. F., Rohmah Z., Ambut C. V., Choi Y. J., Mussatto B. D. C., 2015.- Enzyme-assisted extraction of anticoagulant polysaccharide from *Liparistessellatus* eggs. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 74: 601–607.

[35].- Chen Z. G., Zhang D. N., Zhu Q., Yang Q. H., Han Y. B., 2014.-Purification, preliminary characterization and in vitro immunomodulatory activity of tiger lily polysaccharide. Carbohydrate Polymers, vol.106: 217–222.

Tel/Fax : (+213) 029 71 56 89 e-mail : polysac2017@gmail.com