

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté de sciences de la nature et de la vie

Département des sciences biologiques



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

BENDERRADJI Hayat et MEDJOU DJ Manel

Thème

**Activité anti-complément de quelques extraits
de polysaccharides d'*Astragalus gombo***

Soutenu publiquement le :07/07/2019

Devant le jury :

Président :	M ^{me} .HADJADJ S.	(MCA) UKM	Ouargla
Encadreur :	M.CHOUANA T.	(MCB) UKM	Ouargla
Co-Encadreur:	M. KERBOUA K.E.	(MAHU) UKM	Ouargla
Examineur :	M ^{me} .IDDER-SAYAH Z.	(MCB) UKM	Ouargla

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Avant tous nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir réaliser ce travail de fin d'étude.

Au terme de ce travail nous tiens particulièrement à exprimer nos profondes gratitudees et à remercier :

Mr CHOUANA TOUFIK qui nous avoir accordé sa confiance

et pour nous avoir dirigé ce travail et accepté de nos encadrer, pour ses conseils et orientations tout au long de la période d'encadrement et d'enseignement.

Mr KERBOUA KHEIR EDDINE Maître Assistante à la Faculté de Médecine de Ouargla, qu'il trouve ici l'expression de nos profondes reconnaissances et respects pour nous avoir dirigé ce travail et pour ses conseils et son encouragement tout au long de la période de réalisation de ce travail.

Mlle HADJADJ SOUMIA de nous avoir honoré pour présider notre jury.

Mme IDDER SAYAH ZINEB, pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Sans oublier de nous présentons nos remerciements à Mr HADJ MAHFOUD et Mr BOUAL ZAKARIA et notre collègue MAHCENE SALEM et Mlle BOUZIANE GHANIA pour leurs encouragements et leur aide. Et nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidés.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents ma mère BEKKACHE RACHIDA et mon père ABD ELHAFID pour leur amour et qui m'ont toujours soutenu durant mes études et qui ont été toujours présents pour moi.

A l'esprit des mes grands pères et mes grands-mères.

A mes sœurs WISSAM et KARIMA et mes frères HAMZA et le petit ANISS pour leur encouragement et soutien.

A tous mes tantes et mes oncles et toute ma grande famille

A mes amies surtout ma chère amie MANEL qui m'a accompagné tout au long de la période de réalisation de ce travail, ma chère amie NARIMAN, RAYAN, SOURIA, SABRINA, HANAN et ma petite cousine ASMA.

A toute la promotion de 2ème année Master Biochimie appliquée 2018/2019.

BENDERRADJI HAYAT

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents ma mère LAMNIAI AICHA et mon père AZZEDDINE qui m'ont toujours offert leurs aides morales et leur soutien et leur amour durant mes études et toute ma vie.

A mon grand père ABD ERRAZAK et mes grandes mères SOUDANI ZOËRA ET BEN AMNA SALIHA.

A l'esprit de mon grand père LAMNIAI MOHAMMED TAYEB.

A mes sœurs FATIMA, IBTISSEM, BOUTHAINA, WAFA et mes frères YAHIA et AMINE.

A mes toutes mes tantes et spécialement ma tante NACIRA et son mari NEKHLA SAID et tous leurs enfants spécialement MERIEM et RADJA et tous mes oncles surtout mon oncle MOHAMMED BACHIR et toute ma grande famille.

A mes amies surtout ma chère amie HAYAT pour sa formidable amitié, chère amie NARIMAN, MAIMOUNA, SARAH, AMEL, FATIMA.

A toute la promotion de 2ème année Master Biochimie appliquée 2018/2019.

MANEL

MEDJOUDJ

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

ACD : Acide citric dextrose

ACP : Alternative Complement Pathway

AP100 : Alternative pathway

Ara: Arabinose

C : Complément

CAM: Complexe d'Attaque Membranaire

CCP : Classical Complement Pathway

CCP : Complement control Protein

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

DP : Degré de Polymérisation

EGTA : Ethylène Acid Glycol Tétracétique (Acide éthylène glycol tétra acétique)

FH : Facteur H

GAGs : GlycosAminoGlycanes

Gal : Galactose

GalA : Acide Galacturonique

Galp : Galactopyranosyl

GlcA : Acide glucuronique

Glc: Glucose

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HG : Homogalacturonanes

Ig : Immunoglobulines

iC3b : Inactif C3b

Inactif C3b: Inactif C3b

LCP: Lectin Complement Pathway

LP : Lytic Pathway

MASP : MBL Associated Serine Protease

MBL : Mannose-Binding Lectin

MCP : Chapitre I

NHS : Sérum Humain Normal

NK : Natural Killer

PBS : Phosphate buffer salin

PHN : Plasma Humain Normal

PS1 : Polysaccharide 1

PS2 : Polysaccharide 2

PSG : Polysaccharide galactomannane

PSR : Polysaccharide de racine

RG : Rhamnogalactanes

Rha: Rhamnose

SM : Spectrophotométrie de Masse

Xyl: Xylose

LISTE D'ANNEXES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES PHOTOS

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.1. Le système immunitaire.....	4
1.1.1. Les cellules myéloïdes.....	5
1.1.2. Les cellules lymphoïdes.....	5
1.1.3. Le système de complément.....	5
1.1.3.1. La biosynthèse des composants protéiques de complément.....	6
1.1.3.2. La nomenclature.....	7
1.1.3.3. Les voies d'activation du complément.....	7
1.1.3.3.1. La phase d'initiation.....	7
1.1.3.3.2. La voie classique.....	8
1.1.3.3.3. La voie des lectines.....	8
1.1.3.3.4. La voie alterne.....	9
1.1.3.3.5. La voie effectrice commune.....	10
1.1.3.4. La régulation.....	10
1.1.3.5. La régulation de la voie alterne.....	11
1.1.3.6. Les rôles biologiques de complément.....	14
1.1.3.7. Certaines situations pathologiques associées au système de complément.....	15
1.2. Les glucides	17
1.2.1. Les monosaccharides.....	17

1.2.3. Les oligosaccharides.....	19
1.3. Les polysaccharides.....	19
1.3.1. Classification.....	20
1.3.1.1. Selon la composition chimique en monomères.....	20
1.3.1.1.1. Homopolysaccharides.....	20
1.3.1.1.2. Hétéropolysaccharides.....	20
1.3.1.2. Selon leurs origines.....	21
1.3.1.2.1. Polysaccharides animaux.....	21
1.3.1.2.1.1. L'héparine.....	21
1.3.1.2.1.2. Le glycoène.....	21
1.3.1.2.2. Polysaccharides d'algue.....	22
1.3.1.2.3. Polysaccharides bactériens.....	22
1.3.1.2.4. Polysaccharides végétaux.....	22
1.3.1.2.4.1. Polysaccharides de réserve.....	23
1.3.1.2.4.1.1. Amidon.....	23
1.3.1.2.4.1.2. Fructane.....	24
1.3.1.2.4.1.3. Galactomannanes.....	24
1.3.1.2.4.1.3.1. Structure moléculaire des galactomannanes.....	25
1.3.1.2.4.1.3.2. Répartition des unités galactose sur la chaîne de mannane.....	26
1.3.1.2.4.2. Polysaccharides de structure.....	27
1.3.1.2.4.2.1. Cellulose.....	27
1.3.1.2.4.2.2. Hémicellulose.....	27
1.3.1.2.4.2.3. Pectines.....	27
1.3.1.2.4.2.3.1. Homogalacturonane.....	29

1.3.1.2.4.2.3.2. Xylogalacturonane	30
1.3.1.2.4.2.3.3. Arabinogalactan I	30
1.3.1.2.4.2.3.4. Arabinogalactan II	31
1.3.1.2.4.2.3.5. Rhamnogalacturonan I	31
1.3.1.2.4.2.3.6. Rhamnogalacturonan II.....	32
1.3.1.2.4.2.3.7. Application des pectines	32
1.3.2. Les activités biologiques des polysaccharides.....	33
1.3.2.1. L'activité immunomodulatrice.....	33
1.3.2.1.1. L'activité anti complémentaire.....	34
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	36
2.1. Matériel.....	36
2.1.1. Appareillages et petits matériels.....	36
2.1.2. Produits chimiques, réactifs et matériel biologique.....	36
2.2. Méthodes.....	37
2.2.1. Préparation des 4 solutions initiales à partir des (4) extraits polysaccharidiques.....	37
2.2.2. Préparation des 4 solutions mères.....	37
2.2.3. Préparation des dilutions de chaque solution mère.....	38
2.2.4. L'étude de l'activité anti complément des (4) fractions polysaccharidiques Par la technique hémolytique AP100.....	38
2.2.5. Mode opératoire de la technique hémolytique AP100.....	39
2.2.6. L'utilisation de la technique hémolytique AP100 pour l'étude d'activité Anticcomplément des (4) fractions polysaccharidiques.....	42
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	49

3.1. Etude de l'activité anticomplémentaire des (4) fractions polysaccharidiques...	49
3.1.1. La fraction PS1.....	49
3.1.2. La fraction PSR.....	50
3.1.3. La fraction PSG.....	51
3.1.4. La fraction PS2.....	52
3.2. La nature d'inhibition de l'activation de la voie alterne du complément par les (4) fractions polysaccharidiques étudiées.....	59
3.3. Comparaison entre le pouvoir inhibiteur des 4 fractions Polysaccharidiques.....	65
3.4. La bi fonctionnalité de l'héparine.....	69
3.4.1. L'activité inhibitrice de l'héparine.....	70
3.4.2. L'activité activatrice de l'héparine.....	72
CONCLUSION GENERALE.....	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1: Photo de modèle de boîte d'agarose poulet-érythrocytaire (AP100).

ANNEXE 2: Tableau des différents composants (fragments/complexes) de système de complément avec leurs concentrations sériques.

ANNEXE 3: la plante source des 4 fractions polysaccharidiques étudiées appartenant à l'espèce *Astragalus gombo*.

ANNEXE4:les différents récepteurs de fragment C3b.

ANNEXE5:exemples sur les pathologies associées au système de complément.

ANNEXE6: laboratoire d'immunologie de la faculté de médecine Ouargla.

ANNEXE 7:: Tableau des valeurs de constante de variabilité (CV) des mesures calculées par Excel.

LISTE DES FIGURES

Figure 1:l'oigine des différentes cellules immunitaires(Orkin <i>et al.</i> ,2008).....	5
Figure 2: Schéma d'activation et d'amplification de la voie classique de complément (Abbal,2011).	8
Figure 3 : Schéma d'activation et d'amplification de la voie alterne de complément (Abbal,2011).	9
Figure 4: la voie effectrice commune et la formation de complexe d'attaque.....	10
Figure 5 : les trois voies distinctes d'activation de système du complément avec leurs protéines régulatrices (Rosain <i>et al.</i> , 2014).	11
Figure 6 :Les principales protéines régulatrices de la voie alterne du complément (Dragon-Durey, 2011).....	12
Figure 7 : Représentation schématique des différentes fonctions biologiques du complément après son activation (Dragon-Durey, 2011).	14
Figure 8 : Exploration de complément dans le cadre d'une recherche d'un déficit immunitaire (Rosain <i>et al.</i> , 2014).	15
Figure 9 : les différents aldoses constitutifs des polysaccharides (Florian <i>et al.</i> , 2005).....	18
Figure 10: les différents cétooses constitutifs des polysaccharides (Florian <i>et al.</i> , 2005).	19
Figure 11 :Structur.chimique du glycogène(Chouana,2017)	22
Figure 12Structure de l'amylose (Wertz, 2011).....	23
Figure 13 : Stucture moléculaire de l'amylopectine (Wertz,2011)	24
Figure 14: Structure moléculaire des galactomannanes (Secouard <i>et al.</i> , 2007).....	26
Figure 15: Différents types de distribution des résidus de galactose le long de la chaine de mannane (Dakia <i>et al.</i> , 2010).....	26
Figure 16: Formule chimique de la cellulose (Chouana, 2017).	27
Figure 17 : Représentation schématique des éléments structuraux de pectine (Voragen <i>et al.</i> , 2009).....	29
Figure 18 :Structure primaire d'un homogalacturonane (Agnan <i>et al.</i> , 2011).....	30
Figure 19 : Structure de Xylogalacturonan (Chouana, 2017).	30
Figure20 : Structure des RG-I (Chouana, 2017).	31
Figure 21 :Structure des RG-II (Chouana, 2017).	32
Figure 22 : la courbe représentant le taux d'inhibition des trois dilutions de la fraction PS1.	49
Figure 23 : la courbe de taux d'inhibition des trois dilutions de la fraction PSR.....	50
Figure 24 : la courbe de taux d'inhibition des trois dilutions de la fraction PSG.....	51
Figure 25: la courbe de taux d'inhibition des trois dilutions de la fraction PS2.....	52
Figure 26 : la courbe de taux d'activité anticomplémentaire des six dilutions de la fraction PS1.....	59
Figure 27 : la courbe de taux d'activité anticomplémentaire des six dilutions de la fraction PSR.	60
Figure 28 : la courbe de taux d'activité anticomplémentaire des six dilutions de la fraction PSG.	61
Figure 29 :représentation graphique du phénomène d'inhibition.	63
Figure 30 :représentation graphique du phénomène de réversibilité de l'inhibition.....	64
Figure 31 : la courbe de test de la régression linéaire obtenue par SPSS.....	65
Figure 32: les courbes des taux d'inhibition des six dilutions des 4 fractions polysaccharidiques (PS1, PSR, PSG, PS2).....	67
Figure 33 :La courbe de la corrélation bivariée obtenue par SPSS entre la teneur en Glc et le taux d'inhibition de la fraction testée.....	68
Figure 34:La courbe de la corrélation bivariée obtenue par SPSS entre la teneur en Gal et le taux d'inhibition de la fraction testée.....	69
Figure35: la courbe de taux de l'inhibition de l'héparine en fonction des deux doses utilisées.....	70

LISTE DES PHOTOS

Photo 1:la centrifugation du sang de poulet pour l'obtention des érythrocytes.....	40
Photo 2: Lavage (2) fois des érythrocytes de poulet par le tampon de PBS/EGTA/Mg ⁺⁺	40
Photo 3:Préparation de gel d'agarose.	41
Photo 4:la préparation des boites d'agarose érythrocytaire (AP100).	42
Photo 5: Le dépôt du mélange dans les puits du microplaque à l'aide d'une micropipette.	43
Photo 6:La préincubation de la microplaque à l'intérieur de 37 C° Pendant 10 min.	44
Photo 7: Le dépôt du mélange préincubé dans les puits de la boit d'AP100.....	45
Photo 8:L'incubation des boites d'AP100 préparé dand les chambres.	45
Photo 9:Mesure des zones radiales d'hémolyse obtenues après le temps d'incubation.....	46
Photo 10:La préparation de diutions des solutions polysaccharidiques et du PHN.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:les protéines régulatrices de complément.....	13
Tableau 2:les propriétés moléculaire des galactomannanes des gomme de caroube, de guar , de tara et de fenugrec.....	25
Tableau 3:Teneurs en substances pectiques de quelques végétaux.....	28
Tableau 4:les 4 solutions polysacchridique initiales.	37
Tableau 5:la préparation des 4 solutions mères.....	38
Tableau 6:la préparation des 3 dilutions de chaque solution mère.....	38
Tableau 7:la préparation des 6 dilutions de la fraction PSG.	47
Tableau 8:la préparation des 6 dilutions de la fraction PS1	48
Tableau 9:la préparation des 6 dilutions de la fraction PS2	48
Tableau 10:la préparation des 6 dilutions de la fraction PSR.....	48
Tableau 11:les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les trois dilutions de la fraction PS1 ..	49
Tableau 12:les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les trois dilutions de la fraction PSR.....	50
Tableau 13:les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les trois dilutions de la fraction PSG.....	51
Tableau 14:les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les trois dilutions de la fraction PS2.	52
Tableau 15:la composition en monosaccharide (% molaire) des deux fractions polysaccharidique PS1 et PS2.	56
Tableau 16:la composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique (PSG) des graines d' <i>Astragalus gombo</i>	58
Tableau 17:Valeurs des concentrations des fractions polysaccharidiques responsables de la réversibilité de phénomène de l'inhibition.....	64
Tableau 18:les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les deux différentes doses de l'heparine.	69

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

Depuis la dernière décennie, les composés chimiques extraits des plantes et d'algues présentent un intérêt primordial en tant que sources de nouvelles bioactivités potentielles. Une grande variété d'activités biologiques à partir de plantes médicinales ont été récemment rapportées, en plus de leurs effets médicaux traditionnels. Les médicaments à base de plantes ont suscité un intérêt considérable en tant que remèdes alternatifs contre le cancer en raison de leur faible toxicité et de leur faible coût (Boual *et al.*, 2015). Des études d'ethnobotanique et d'ethnopharmacologie ont montré que des extraits végétaux enrichis en polysaccharides ont longtemps été utilisés en phytothérapie, par divers groupes culturels, dans le monde. Compte tenu de la grande hétérogénéité structurale des polysaccharides, de nombreuses activités biologiques ont été mises en évidence, telles que les antioxydantes, les antivirales, antimicrobiennes, antiparasitaires ou anti-inflammatoires, anticancéreuses et également l'activité anti-complémentaire (Angone *et al.*, 2010; Boual *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Ces polysaccharides actifs présentent des motifs presque similaires, mais qui ont des différences structurales mineures. Ces différences structurales affectent parfois de façon importante, l'activité biologique, ou la cible dans la réponse immunitaire.

Nous savons que le système immunitaire est un système très complexe qui protège l'organisme contre des maladies telles que la grippe, les infections bronchiques, le cancer et bien d'autres. Le complément, composant essentiel du système immunitaire inné, est composé de plus de 30 protéines activées en cascade protéolytique, avec des mécanismes effecteurs médiés par plusieurs récepteurs spécifiques. Le complément est le plus abondant dans le sang, mais tous ses composants sont également présents dans les tissus, que ce soit par diffusion ou par transport local. Il joue un rôle crucial dans l'élimination des agents pathogènes envahissants et la génération d'une réponse optimale de l'hôte. Il peut être activé par un mécanisme en cascade de la voie classique (CP), de la voie alternative (AP) ou de la voie des lectines (Carroll et Fischer, 1997). Cependant, une multitude de données a clairement démontré que l'activation incontrôlée notamment l'activation excessive du complément est responsable de l'initiation de l'amplification ou de la perpétuation des lésions tissulaires et de l'inflammation dans un certain nombre de situations pathologiques telles que le lupus érythémateux systémique, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), etc (Morgan *et al.*, 2003).

Les polysaccharides, tels que les arabinogalactanes, les galactanes et les glucanes, sont supposés posséder une activité immunomodulatrice, interagissent directement ou indirectement avec le système immunitaire plus précisément le système du complément et déclenchent plusieurs événements cellulaires (Jia *et al.*, 2018).

Introduction

En 1929, Ecker et Gross découvrent l'effet anti-complément de l'héparine, un copolymère hautement sulfaté composé d'acide uronique et de glucosamine. L'héparine est maintenant reconnue comme l'une des molécules les mieux caractérisées qui présente une activité anti-complémentaire profonde. Ces dernières années, de nombreuses études sont concentrées sur la médecine traditionnelle chinoise pour rechercher les composés anti-complémentaires avec peu d'activité anticoagulante. Ces molécules actives comprennent principalement les polysaccharides par exemple les dérivés sulfatés d'homogalacturonanes pourraient être des candidats-médicaments prometteurs pour l'inhibition thérapeutique du complément (Wang *et al.*, 2013).

La famille Fabaceae est une grande famille de plantes renferment les espèces les plus riches et diversifiées des parcours sahariens du Sud-est algérien notamment Ouargla (Chehema *et al.*, 2005) y compris les arbustes et les plantes herbacées vivaces ou annuelles, actuellement utilisées en médecine traditionnelle. L'astragale est considéré comme le plus grand genre de Fabacées. À ce jour, de nombreux composés tels que les flavonoïdes, les saponines, les alcaloïdes, les polysaccharides, les stérols ou les composés phénoliques d'espèces différentes d'*Astragalus* ont été identifiés (Boual *et al.*, 2015).

Les polysaccharides végétaux appartenant au genre *Astragalus* sont traditionnellement utilisés pour leurs vertus thérapeutiques et ont également montré des effets thérapeutiques dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes. Les études *in vitro* de Han. (2013), ont prouvé que les polysaccharides d'*Astragalus* possèdent un effet inhibiteur sur l'inflammation (Chouana, 2017). Il s'agit d'une plante pérenne commune et endémique. Certains polysaccharides issus de feuilles, graines, tiges ou racines de plantes appartenant au genre *Astragalus* ont déjà été décrits pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-tumorales, anti-inflammatoires ou immunomodulatrice. Parmi les polysaccharides du genre *Astragalus* qui ont été étudiés pour leurs activités biologiques potentiels notamment l'activité anti complémentaire, les polysaccharides extraits à partir de l'espèce *Astragalus gombo* ont fait l'objet de notre travail parce que selon les données aucune étude sur l'activité anti complémentaire des extraits polysaccharidiques d'*Astragalus gombo* n'a été réalisée (Boual *et al.*, 2015; Chouana, 2017).

Vue à la sévérité des maladies associées à l'hyper activation de système du complément à titre d'exemple le cancer et les maladies inflammatoires d'une part, et les effets secondaires sévères, les complications et le caractère toxique de la pharmacologie chimique d'autre part, les études contemporaines s'orientent sur l'étude de l'inhibition thérapeutique du système de complément par le baie des polysaccharides biologiquement actifs.

Introduction

Dans ce cadre et en parallèle avec ces études, l'objectif de notre travail de fin d'étude est d'étudier l'activité inhibitrice de l'activation du système de complément (anti complémentaire) via la voie alterne des extraits polysaccharidiques issus d'*Astragalus gombo* obtenus à partir des différents tissus de la plante notamment des tiges (PS1, PS2), des graines (PSG) et des racines (PSR) par l'exploitation de la technique hémolytique fonctionnelle AP100. Ces polysaccharides servent à long terme comme des médicaments à intérêt thérapeutique prometteur orientés afin de traiter les situations pathologiques associées au système de complément vu qu'ils sont des biopolymers naturels, non toxiques et non couteux.

Ce travail est structuré en quatre chapitres :

Le premier chapitre est adressé à une synthèse bibliographique, traite en premier temps le rôle majeur de système immunitaire dans la protection de l'organisme contre les invasions infectieuses dont on a focalisé surtout sur une composante cruciale de ce système qui est le système de complément, ses voies d'activations (classique, de lectines et alterne), sa régulation plus précisément celle de la voie alterne, ses rôles biologiques et les quelques situations pathologiques lui associées, en deuxième temps une présentation des polysaccharides, leurs classifications selon différents critères où on a parlé sur les polysaccharides pectiques et le galactomannane, leurs activités biologiques notamment l'activité anti complémentaire.

Le deuxième chapitre intitulé : matériel et méthodes qui sert à l'étape expérimentale. Dans cette étape on a réalisé une préparation des boîtes d'agarose-érythrocytaires caractérisant la technique hémolytique fonctionnelle de la voie alterne (AP100) puis on exploite ces boîtes d'AP100 pour l'étude de l'activité anti complémentaire des quatre fractions polysaccharidiques (PS1, PS2, PSG et PSR) et pour déterminer le taux d'inhibition de la voie alterne de complément de chaque fraction étudiée.

Ces trois chapitres mentionnés sont précédés par une introduction générale et enfin une conclusion générale répondra à la problématique posée dans l'introduction générale et également portera sur une lecture attentive et profonde des différents résultats obtenus et des perspectives, ainsi qu'une liste des références bibliographiques qui ont été exploitées dans le cadre de notre travail.

CHAPITRE 1:
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Le système immunitaire

L'organisme est soumis à une menace constante d'invasions par des agents pathogènes provenant du milieu extérieur. Il développe en conséquence différents systèmes de protection, dont le système immunitaire qui détruit ou inactive spécifiquement les éléments exogènes reconnus comme des corps étrangers (Tachdjian *et al.*, 2016). L'immunité est définie comme la résistance aux maladies, et plus spécifiquement aux maladies infectieuses. L'ensemble des cellules, des tissus et des molécules qui concourent à opposer une résistance aux infections est appelé système immunitaire, et la réaction coordonnée de ces cellules et molécules contre les germes pathogènes porte le nom de réponse immunitaire (Tachdjian *et al.*, 2016). Le système immunitaire est constitué d'un ensemble complexe d'organes individualisés et de tissus entre lequel circulent, de façon constante, des cellules immunocompétentes de l'immunité innée et adaptative (Nissen *et al.*, 2013). La défense immunitaire est assurée et orchestrée par l'intervention des différents types cellulaires en interaction *vis à vis* d'un agent pathogène (Tachdjian *et al.*, 2016). La quasi-totalité des cellules immunitaires dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pluripotentes qui se localisent dans la moelle osseuse (Aymeric *et al.*, 2009). Ces cellules sont définies par deux particularités : la capacité de s'auto-renouveler, c'est-à-dire de se régénérer, et également la capacité de se différencier en divers types cellulaires (Owen *et al.*, 2014). Elles sont très peu nombreuses (une CSH pour 50000 cellules dans la moelle osseuse), et leur nombre est strictement régulé par un équilibre (Owen *et al.*, 2014).

Les CSH produisent tous les composants cellulaires sanguins comme la figure 1 indique, dont les cellules immunitaires, pendant le développement embryonnaire et tout au long de la vie adulte pour produire et reconstituer le système sanguin, cela par le processus physiologique de l'hématopoïèse (Jagannathan-bogdan *et al.*, 2013). Lorsque il ya une demande accrue d'hématopoïèse, par exemple lors d'une infection, ces CSH montrent une énorme capacité de prolifération pour donner les cellules immunitaires de différentes lignées, suite aux réponses aux différentes stimulations par les cytokines (Defranco *et al.*, 2009; Owen *et al.*, 2014). Les CSH se différencient soit en cellules progénitrices myéloïdes, soit en progénitrices lymphoïdes, à leur tour ces cellules progénitrices se différencient en différentes cellules matures (Aymeric *et al.*, 2009).

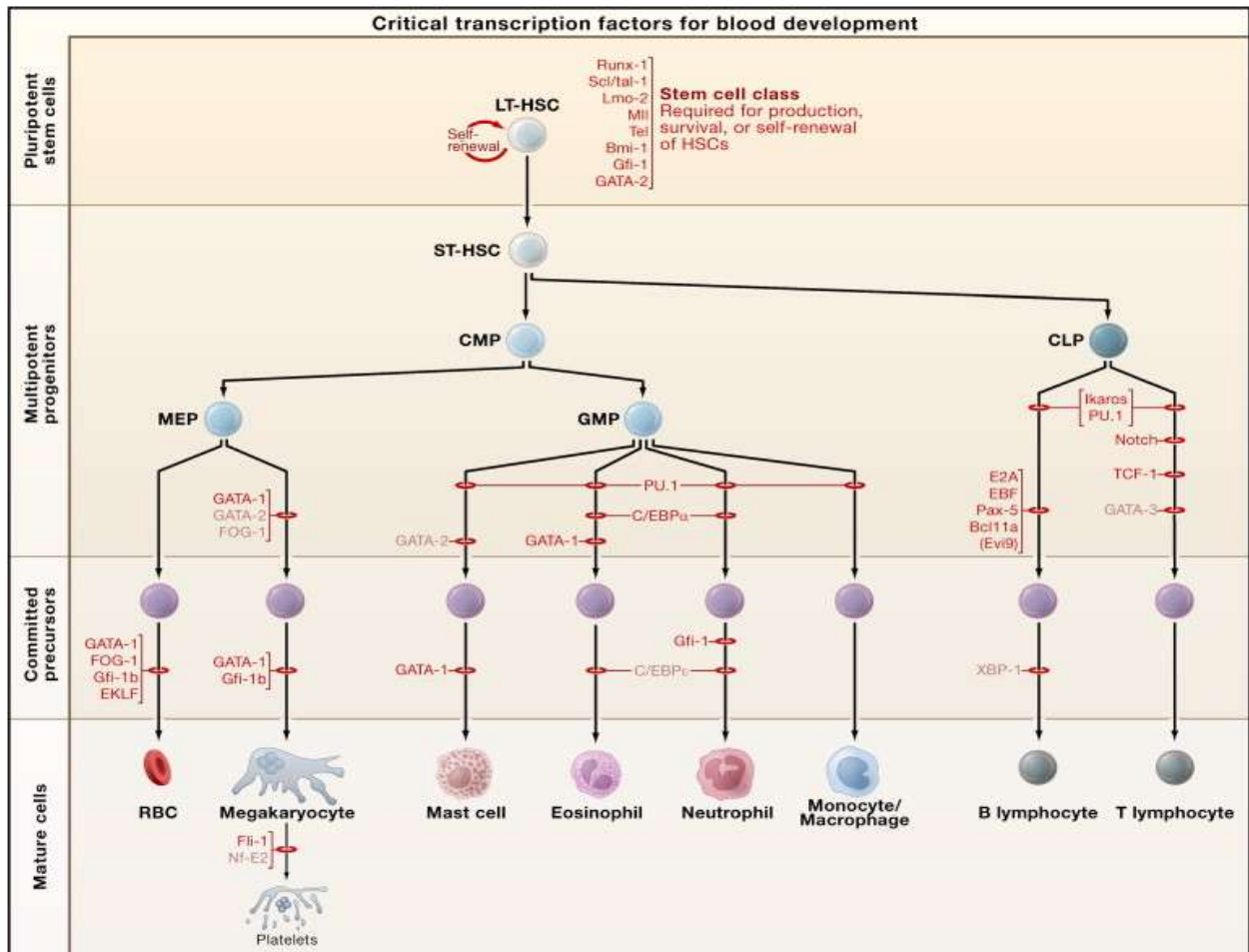


Figure 1:l'origine des différentes cellules immunitaires (Orkin *et al.*, 2008).

1.1.1.Les cellules myéloïdes

Au cours de l'hématopoïèse, la lignée myéloïde génère les polynucléaires (Basophiles/ neutrophiles/ éosinophiles) et les phagocytes mononuclés (macrophages à partir des monocytes) ainsi que les érythrocytes et les plaquettes sanguines.Ces cellules relèvent toutes de l'immunité innée (Aymeric *et al.*, 2009).

1.1.2.Les cellules lymphoïdes

Appelées lymphocytes, qui sont trois lymphocytes T, lymphocytes B et les cellules NK. Ces cellules relèvent de l'immunité adaptative spécifique (Aymeric *et al.*, 2009).

1.1.3.Le système de complément

L'un des mécanismes de défense qui peut intervenir pour faire le lien entre les deux types d'immunité innée et adaptative à la fois, est le système de complément. Le système du complément représente une composante évolutive thermolabile d'un plasma normal qui augmente l'opsonisation et la destruction lytique ultérieure des bactéries par les anticorps et

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

permet aux anticorps de tuer certaines bactéries où il constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes envahissants (Freeley *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2018). Il a été découvert en 1894 par Jules Bordet, en mélangeant un sérum normal et un sérum immun inactivé par la chaleur, le complément (C) a été nommé en 1901 par Paul Erlich comme activité sérique complétant l'activité bactéricide de l'anticorps (Nonaka *et al.*, 2004; Kolev *et al.*, 2017). Il comprend des protéines plasmatiques pour la majorité et d'autres sont des récepteurs membranaires. Certaines protéines participent à l'activation du complément (par les voies classique, alterne, des lectines ou finale commune) dont la plupart d'entre elles acquièrent leurs activités biologiques séquentiellement en cascade et enfin des protéines membranaires et sériques sont impliquées dans les mécanismes de régulation de cette cascade (Fremeaux-bacchi *et al.*, 2012). Toutes les protéines de complément sont codées par des gènes situés sur des chromosomes somatiques à l'exception de la properdine qui est codée par le chromosome X (Rosain *et al.*, 2014). Plusieurs composants de complément sont des protéases, qui sont-elles mêmes activées par clivage protéolytique (Janeway *et al.*, 2003).

1.1.3.1. La biosynthèse des composants protéiques de complément

Le système du complément est composé de plus de 30 protéines qui agissent comme activateurs ou modulateurs (Theroux et martel, 2006). Les précurseurs de ces composants protéiques sont appelés zymogènes (Janeway *et al.*, 2003). Ces protéines fonctionnent dans le plasma, dans les tissus ou dans les cellules (Merle, 2015). Différents types de cellules, produisent ces protéines dans divers tissus mais principalement par les hépatocytes, car le foie est le principal tissu producteur de complément. Il fournit 90% des composants plasmatiques à l'exception du C1q et des facteurs D et P, qui ne sont pas synthétisés par l'hépatocyte (Gasque *et al.*, 1996;Théroux et Martel, 2006). A côté de cette synthèse massive d'origine hépatique, un grand nombre de types cellulaires ont été décrits comme producteurs de protéines du complément. Ce sont les cellules de la lignée monocyte/macrophage qui ont été tout d'abord décrites comme source extra hépatique du complément et également les cellules épithéliales de l'intestin peuvent prendre le relais (Théroux et Martel, 2006; Gasque *et al.*, 1996). La synthèse fœtale des composants du complément débute dès la sixième semaine de gestation. A la naissance, les taux de ces différents composants sont très variables. Proches des valeurs adultes pour la voie classique et voisines de 50% pour la voie alterne (Millet *et al.*, 1999).

1.1.3.2. La nomenclature

La nomenclature nécessite une terminologie aussi simple que claire et aussi non ambiguë que possible. Le complément est indiqué par la lettre majuscule. Les composants de la voie classique et de la séquence terminale sont signalés par "C" pour complément, suivi d'un nombre représentant l'ordre dans lequel le composant a été découvert; ainsi, C1 a été découvert en premier, puis C2, etc. Malheureusement, ces composants ne réagissent pas dans l'ordre exact dans lequel ils ont été découverts. Les lettres q, r, s des fragments C1q, C1r et C1s, désignent leur ordre d'éluion par la chromatographie échangeuse d'ion sur DEAE-Cellulose (Fine, 2017; Kemper *et al.*, 2014). La lettre «i» trouvée avant le C fait référence à des fragments clivés qui sont inactifs. Les protéines de la voie alternative, souvent appelées facteurs, sont simplement décrites et différenciés par des lettres majuscules par exemple facteur B, facteur D, la properdine lui-même est appelé seulement "P" (Theroux et Martel, 2006; Fine, 2017). Il a été convenu que lorsque les protéines sont clivées, un minuscule "a" ou "b" est ajouté au nombre pour décrire le composant de clivage le plus petit et le plus grand (par exemple le poids moléculaire de C3a est d'environ 10.000Da et C3b est d'environ 165.000Da), respectivement, à l'exception de C2b qui est inférieur à C2a (Theroux et Martel, 2006; Fine, 2017).

1.1.3.3. Les voies d'activation du complément:

Les facteurs protéiques constituant le complément sont sous forme inactive dans le sérum (Letonturier, 2007). Leur activation s'effectue par divers mécanismes, qui diffèrent en fonction de la nature de l'activation. Les trois voies convergent au point où la C3 convertase est activée aboutissant à la formation de la voie commune de complément et finalement la voie terminale (Harris et Claire, 2017). Ceci est évidemment avantageux pour l'hôte car il permet la détection et l'élimination ultérieure d'une large gamme d'agents pathogènes (Freeley *et al.*, 2016).

1.1.3.3.1. La phase d'initiation:

Dans chacune de ces voies proximales, l'étape de reconnaissance précède l'activation, ce qui donne une convertase C3 (C4b2a dans le CCP et C3bBbP dans le LCP et l'ACP). Selon le mode de reconnaissance de l'antigène cible, il existe trois voies principales d'activation : la voie classique, via des complexes antigène-anticorps; la voie alternative, via des surfaces permissives, et la voie des lectines, via la liaison de lectines liant le mannose (MBL) reconnaissant un modèle à des ligands glucidiques à la surface d'agents pathogènes (Ricklin *et al.*, 2016; Afshar-Kharghan et Vahid, 2017).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Les composants du complément des voies d'activation sont clivés en deux fragments; une sérine protéase active grande qui reste sur la surface de l'agent pathogène (comme C3b, C4b et C5b) et un fragment plus petit qui est libéré pour agir en tant que médiateur soluble (y compris C3a, C4a, C5a) (Janeway *et al.*, 2001).

1.1.3.3.2. La voie classique

C'est la première voie d'activation qui a été découverte et définie (Freeley *et al.*, 2016). Cette voie reconnaît le fragment Fc des molécules d'anticorps, d'IgM ou d'IgG d'isotype IgG1, IgG2, IgG3 lorsqu'ils sont liés à des antigènes et font partie de complexes immuns. Le composant d'initiation est la protéine de reconnaissance C1q, qui lors d'interactions appropriées, est amené à associer les protéases à la sérine C1r et C1s pour former le composant C1 (formé des sous unités q, r et s), un grand complexe enzymatique qui active la cascade d'activation de cette voie. Le processus d'activation est montré dans la figure ci-dessous (Fremaux-bacchi *et al.*, 2012; Larghi *et al.*, 2014; Rosain *et al.*, 2014). Le complexe C1 est capable de cliver séquentiellement C4 et C2, produisant respectivement C4b et C2a, qui s'assemblent pour former la CCP convertase C3; C4b2a (la C3 convertase classique) sur la surface activatrice entraînant le clivage du C3 en C3b (Fremaux-Bacchi *et al.*, 2012; Larghi *et al.*, 2014).

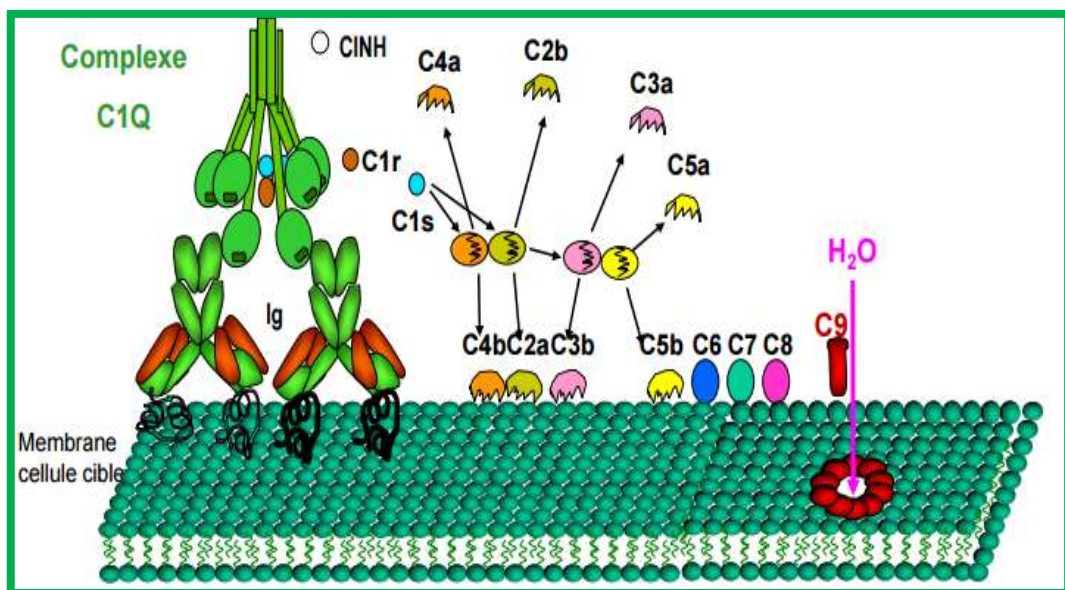


Figure2: Schéma d'activation et d'amplification de la voie classique de complément (Abbal, 2011).

1.1.3.3.3. La voie des lectines

Elle est initiée par la fixation des lectines sériques, à des résidus glycosylés de bactéries ou de virus. Elle fait intervenir des protéines de reconnaissance, la protéine MBL (mannose-

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

binding lectin) qui est une protéine soluble de la famille des lectines capable de reconnaître des micro-organismes pathogènes et les ficolines et des sérines estérases les MASP1 et MASP2 (MBL-associated serine protease), qui une fois activées, ont la capacité d'induire ainsi la formation d'une LCP C3 convertase identique à CCP C3 convertase (Fremeaux-Bacchi *et al.*, 2012; Rosain *et al.*, 2014). Son rôle dans la défense contre l'infection est néanmoins restreint. Cette voie représente un système accessoire de résistance naturelle à l'infection (Fremeaux-bacchi *et al.*, 2012).

1.1.3.3.4. La voie alterne

Elle représente la première ligne de défense contre l'infection, à la particularité d'être active en permanence, à l'opposé des autres voies d'activation du complément (Fremeaux-Bacchi *et al.*, 2012). C'est un véritable système de sauvegarde qui est initié en phase fluide comme la figure ci-dessous indique, par hydrolyse spontanée de la liaison thioester de C3 pour produire C3 (H₂O), qui est fonctionnellement et structurellement similaire à C3b (Cortes *et al.*, 2013). Une fois lié à une surface cible, le C3 activé (C3b) peut lier le facteur B (FB) qui est activé par le facteur D (FD) pour former l'enzyme de clivage C3 convertase C3bBb. Cette enzyme clive le fragment C3, ce processus génère C3 (H₂O) Bb, lequel est capable de cliver des molécules supplémentaires de C3 en C3a et C3b et de former la C3 convertase alterne. Cette dernière occupe la surface de pathogène (opsonisation) (Cortes *et al.*, 2013; Harris et Claire, 2018).

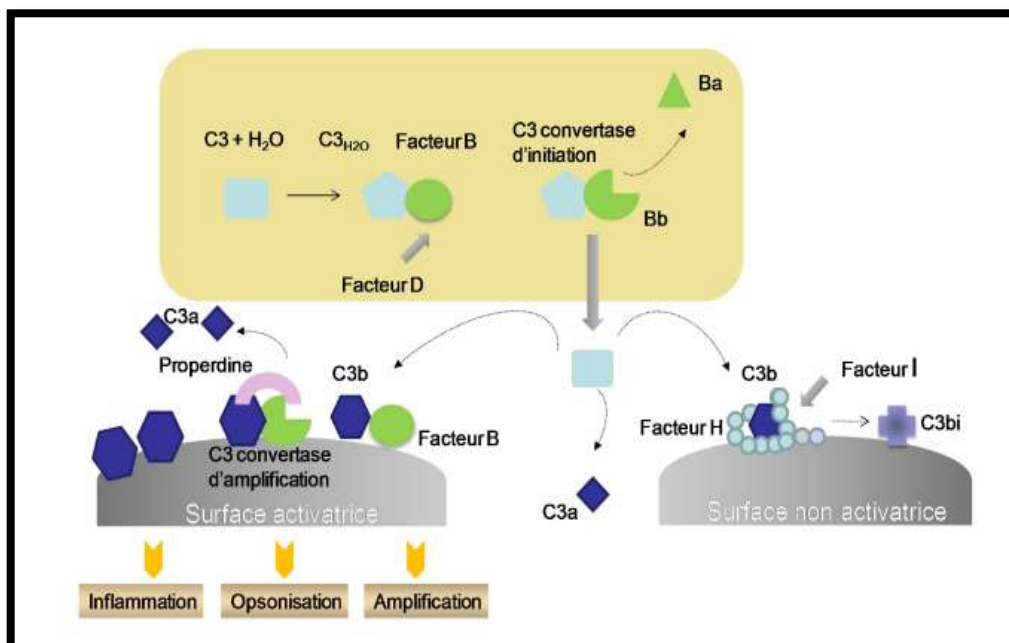


Figure3: Schéma d'activation et d'amplification de la voie alterne de complément (Dragon-Durey, 2011).

1.1.3.3.5. La voie effectrice commune

De manière analogue, l'incorporation de C3b donne les convertases C5 (C4bC2aC3b dans les CCP et LCP, C3bBbC3b dans l'ACP), qui peuvent scinder C5 en C5a et C5b. A leur tour, les complexes C5b avec C6 et C7, qui recrutent C8 et déclenchent la liaison et la polymérisation de C9 par l'addition d'un maximum de six molécules de C9 pour former C5b-9 comme la figure 4 indique, le complexe d'attaque membranaire (CAM) qui est très stable (Fine, 2017; Larghi *et al.*, 2014).

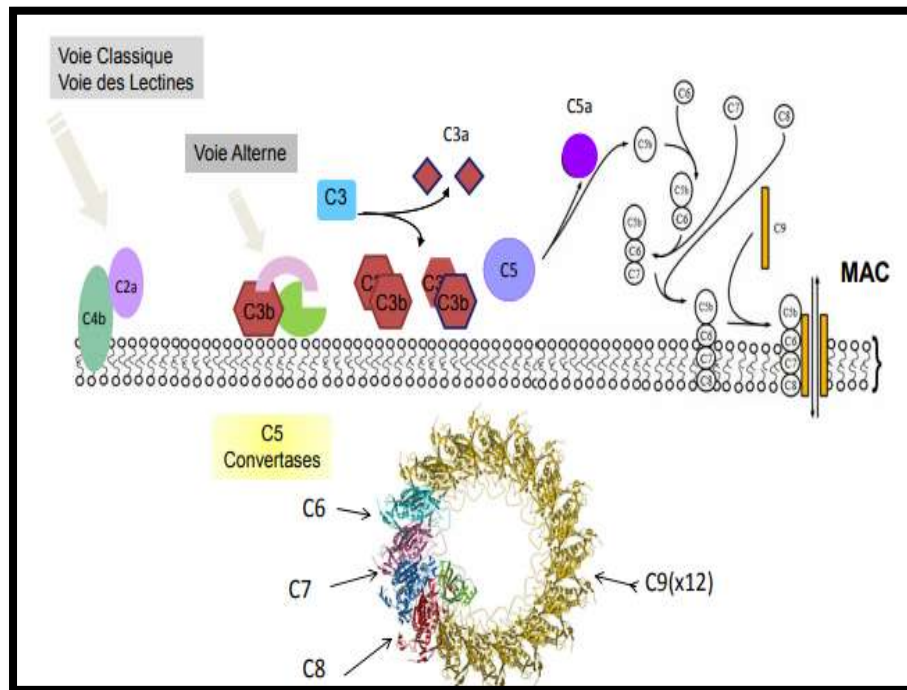


Figure 4 : la voie effectrice commune et la formation de complexe d'attaque membranaire (Dragon-Durey, 2011).

Quelle que soit la voie d'origine d'activation, on peut mentionner que tout fragment de C3b généré peut lier le facteur B, permettant ainsi la propagation de l'activation de C3, et donc servir de «boucle d'amplification», conduisant à la formation de la voie lytique (LP), qui est commune à toutes les voies d'activation (Larghi *et al.*, 2014).

1.1.3.4. La régulation

L'ensemble du système de complément est étroitement régulé par un réseau de protéines plasmatiques et membranaires régulatrices et activatrices intervenant à différents niveaux. Des perturbations de ce système, liées à des anomalies héréditaires ou acquises qui sont associées à différentes pathologies (Rosain *et al.*, 2014). Plusieurs points de contrôle sont en place pour assurer une réglementation appropriée pour ce système (Zewde et Morikis, 2018).

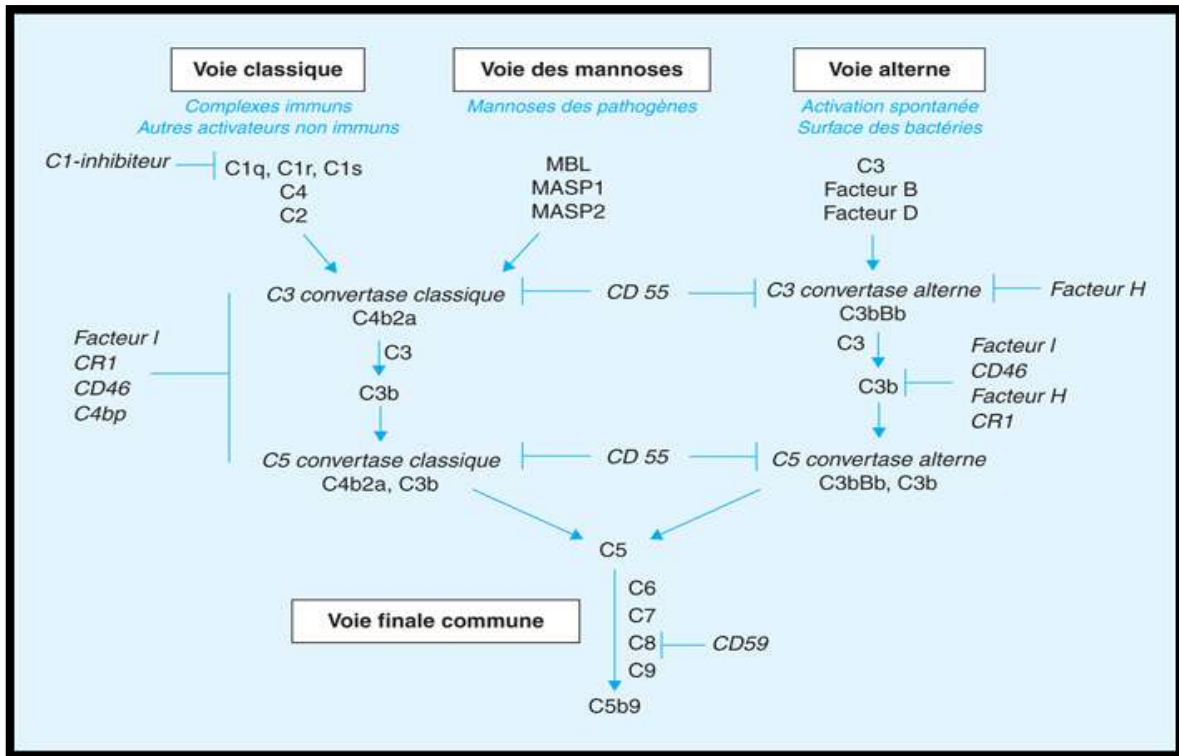


Figure 5 : les trois voies distinctes d'activation de système du complément avec leurs protéines régulatrices (Rosain *et al.*, 2014).

Puisque notre thème de mémoire traite l'activité anti-complément de quelques extraits de polysaccharides plus précisément sur l'activité de la voie alterne de complément, par conséquent nous allons nous concentrer dans la partie de régulation sur la voie alterne qui nous intéresse.

1.1.3.5. La régulation de la voie alterne

Si le C3b ne rencontre pas de pathogène constituant pour lui une surface activatrice amplificatrice, il est rapidement inactivé par un système complexe de régulation dans la circulation sanguine ou sur les tissus du soi. En effet, la voie alterne du complément fait l'objet d'une régulation physiologique fine à plusieurs niveaux qui fait intervenir des protéines sériques, comme le facteur H et le facteur I, et membranaires de régulation comme le CD46 (MCP). En revanche, sa fixation covalente à une surface bactérienne lui permet de recruter le facteur B (FB) et initie l'auto amplification du clivage de C3b (Fremaux-bacchi *et al.*, 2012).

Le facteur H (FH) est le principal régulateur de la phase fluide de la voie alternative d'activation du complément (Wong et Kavanagh, 2018; Dopler *et al.*, 2019). Il joue un rôle crucial dans l'homéostasie de système non seulement dans le plasma mais également dans la protection des cellules hôtes et des tissus hôtes de proximité des dommages causés par l'activation du complément (De cordoba *et al.*, 2004). Ceci est évident en ce qui concerne la

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

suppression du plasma / sérum de FH ou le blocage de FH par les auto-anticorps conduit à l'activation du PA entraînant une surconsommation de complément actif en moins de 30 minutes (Nissilä *et al.*, 2018). Le facteur H a été identifié pour la première fois par Nilsson et Müeller-Eberhard (1965) sous le nom de globuline β 1H. Il est une glycoprotéine plasmatique de poids moléculaire de 155 kDa à chaîne unique présente dans le plasma à une concentration entre 110–615 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (De Córdoba *et al.*, 2004). Le facteur H et comme le cas d'un grand nombre des protéines régulatrices de système du complément est codé par des gènes situés sur le chromosome 1q32 dans une région appelée RCA (regulators of complement activators) (Rosain *et al.*, 2014). La forme sécrétée de la glycoprotéine est composée de 20 unités répétitives de 60 acides aminés (Ripoche *et al.*, 1988), appelées modules de synthèse répétée de consensus (SCR) ou de protéine de contrôle du complément (CCP), disposées de manière continue comme une chaîne de 20 perles, dont son activité régulatrice est assurée par Les domaines 1-4 à l'extrémité N-terminale. Les SCR ont un cadre typique de résidus hautement conservés comprenant quatre cystéines, deux prolines, un tryptophane et plusieurs autres glycines partiellement conservées et résidus hydrophobes (De Córdoba *et al.*, 2004; Mészáros *et al.*, 2016; Nissilä *et al.*, 2018).

Le FH contribue à l'inactivation protéolytique de C3b de la phase fluide ou lié à une surface d'activation générant une molécule inactivée de C3b; iC3b par le facteur I et à l'inhibition simultanée de la liaison du facteur B à C3b. De plus, il empêche l'amplification ultérieure de l'AP en accélérant la décroissance des convertases d'AP formées (Nissilä *et al.*, 2018 ; Mészáros *et al.*, 2016).

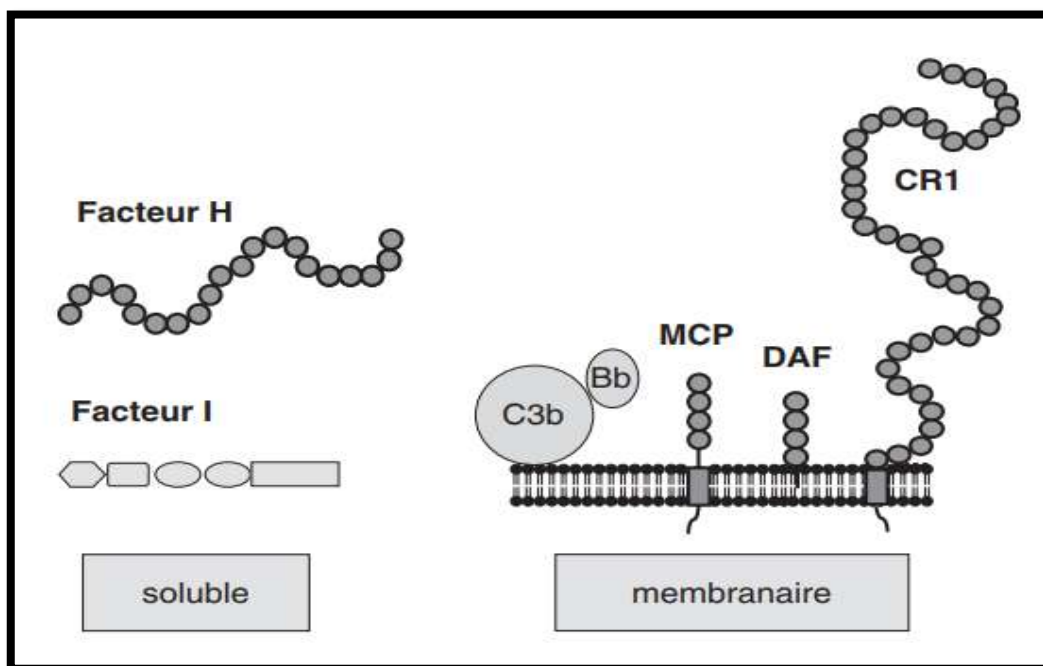


Figure 6: Les principales protéines régulatrices de la voie alterne du complément (Dragon-Durey, 2011).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Cependant, l'inactivation de C3b lié à la surface par le facteur H dépend de la composition chimique de la surface à laquelle C3b est liée. On a d'abord signalé que les acides sialiques et les glycosaminoglycanes (GAGs) présents sur les surfaces qui se lient au FH par son domaine FH 20 de l'extrémité C terminale, influençaient la régulation du C3b lié à la surface par le facteur H par son domaine FH19 de l'extrémité C terminale. D'autres molécules polyanioniques telles que les glycosaminoglycanes sulfatés comme l'héparine et la protéine C-réactive ont également été décrites. Celles-ci interagissent avec le FH par les domaines 6 à 7 de ce dernier. De cette manière, FH distingue les surfaces du soi des surfaces de non-soi (De córdoba *et al.*, 2004; Nissilä *et al.*, 2018).

Tableau 1: les protéines régulatrices de complément.

Protéine	Type	Fonction
C1-inhibiteur	Sérique	Inhibition des sérines estérases C1r, C1s et MASP2
Facteur I	Sérique	Inactivation du C3b et du C4b
Facteur H	Sérique	Inhibition de la formation de la C3 convertase alterne par liaison du C3b, et également co-facteur du facteur I pour C3b
C4bp	Sérique	Régulation de l'activité de la C3 convertase classique, co-facteur du facteur I pour C4b
CD46	Membranaire	Co-facteur du facteur I pour C3b et C4b
CD55	Membranaire	Régulation l'activité des C3 et C5 convertases
CD59	Membranaire	Régulation la voie finale commune en empêchant la liaison du complexe C5b8 à la membrane cellulaire
CR1	Membranaire	Co-facteur du facteur I

Source: (Rosain *et al.*, 2014)

1.1.3.6. Les rôles biologiques de complément

Le système du complément est un élément de défense conservé phylogénétiquement. Même les oursins primitifs, qui sont apparus il y a environ 700 millions d'années, possèdent un système de complément parfaitement fonctionnel. Le système a évolué pour devenir une partie sophistiquée, distincte et importante du système immunitaire inné, utile pour la protection contre la contamination étrangère et le non-soi. Les êtres humains nés avec des systèmes de

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

complément hautement déficient ne vivent pas longtemps avant de succomber à l'infection. En outre, transcendant son rôle dans l'immunité innée, le système complète les associations fonctionnelles forgées avec de multiples voies et réseaux qui modulent les processus biologiques de base. (Harris *et al.*, 2018). Le complément est le plus important composant de système auto-immun humoral, il possède de nombreuses fonctions liées à la protection d'organisme, comme l'élimination des complexes immuns, y compris les bactéries recouvertes d'anticorps et les cellules apoptiques, favorise la destruction des organismes pathogènes par le complexe d'attaque membranaire ou complexe lytique, il forme aussi un interface entre l'immunité innée et adaptative par le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires par chimiotactisme au site d'infection, ... etc. (Theroux et Martel, 2006; Larghi *et al.*, 2014).

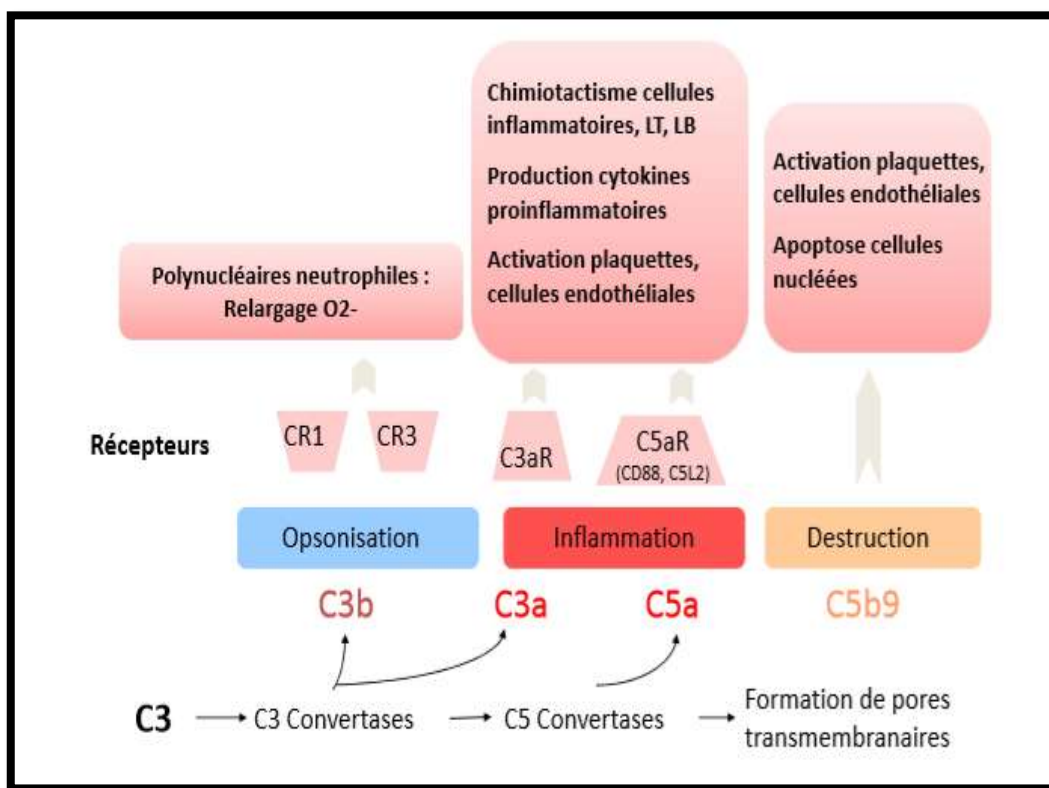


Figure 7: Représentation schématique des différentes fonctions biologiques du complément après son activation (Dragon-Durey, 2011).

1.1.3.7. Certaines situations pathologiques associées au système de complément

Le système du complément est un ensemble de protéines plasmatiques et membranaires impliqué dans l'immunité innée. Il représente le mécanisme de défense naturelle contre les infections (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). La plupart des effets biologiques du complément dépendent de l'interaction des protéines du complément ou de leurs fragments d'activation avec des récepteurs cellulaires spécifiques. Le cascade est étroitement régulée par des protéines plasmatiques et membranaires afin de ne pas être délétère *vis-à-vis* des cellules et

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

des tissus d'organisme. Le complément peut entraîner une aggravation des lésions et des dommages tissulaires du fait du dépôt de complexes d'attaque membranaires (C5b9) et des protéines C3b, par l'intermédiaire des récepteurs. Le complément peut également amplifier les lésions tissulaires par la libération des anaphylatoxines C3a et C5a qui possèdent d'importantes capacités chimiotactiques sur les cellules inflammatoires dont les polynucléaires neutrophiles.

(Rosain *et al.*, 2014; Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). Les déficits en protéines du complément peuvent être héréditaires ou acquis et sont relativement rares mais sont dans tous les cas associés à une prédisposition à développer des pathologies d'une grande diversité clinique, à titre d'exemple les déficits en protéines régulatrices de la voie alterne de complément (le facteur H, le facteur I, MCP ou CD46 et la Properdine) provoquent l'hypersecretion de certains composants de ce système et donc l'hyperactivation de complément via cette voie ou des infections bactériennes à répétition surtout par des bactéries comme *Neisseria meningitidis* (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006).

Le bilan standard d'une exploration de complément inclut un dosage du CH50 associé à un dosage pondéral des fractions C3 et C4 et un test de l'AP50 (Rosain *et al.*, 2014).

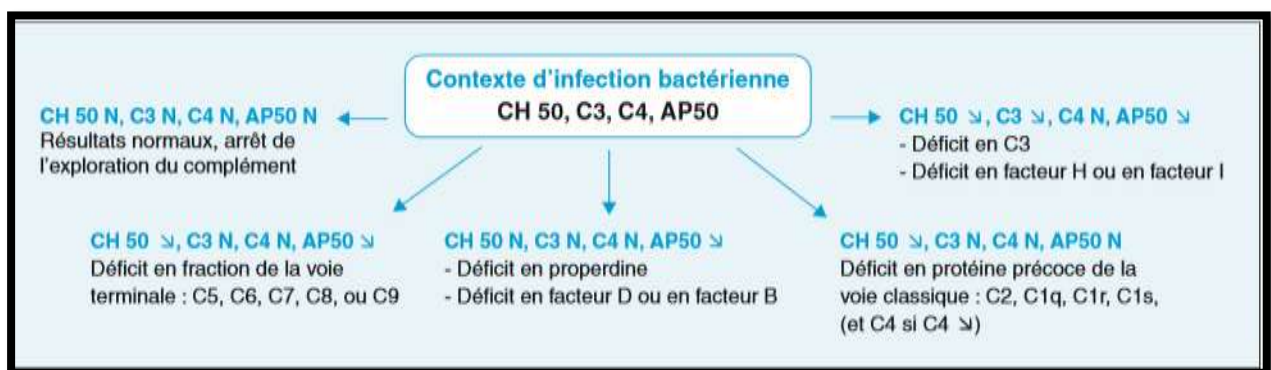


Figure 8: Exploration de complément dans le cadre d'une recherche d'un déficit immunitaire (Rosain *et al.*, 2014).

▪ Atteintes rénales

Plusieurs études récentes ont démontré que plusieurs pathologies rénales étaient associées à une dérégulation de la voie alterne du complément comme la forme atypique du syndrome hémolytique et urémique (SHUa). Des anomalies génétiques et différents auto-anticorps ont été mises en évidence chez des patients présentant cette pathologie, perturbant les fonctions des protéines régulatrices plasmatiques (facteur H, facteur I) ou membranaire (CD46 ou MCP), ou encore de la C3 convertase alterne (complexe C3bBb) (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). Plusieurs études de séries récentes ont montré que le SHUa est associé à des mutations sur 3 gènes (le facteur H, le facteur I et MCP ou CD46) dont le point commun est la régulation de la voie alterne du complément. Les gènes codant pour le facteur H et CD46 sont

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

localisés dans un locus appelé RCA (Regulators of Complement Activation) localisé en 1q32. Des mutations dans le gène codant pour le facteur H ont été mises en évidence chez 10 à 22 % des patients atteints de SHUa, aboutissant ou non à un déficit quantitatif. Dans près de 70 % des cas de pathologie, les mutations sont situées dans la partie C-terminale de la protéine, région particulièrement impliquée dans la liaison du facteur H à C3b mais également à l'héparine et aux poly anions. Il s'agit d'un déficit acquis en facteur H (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). Le SHU atypique peut survenir secondairement au développement d'auto anticorps anti-facteur H, où une chaîne légère monoclonale dirigée contre le facteur H a été purifiée à partir du plasma, induisant un déficit acquis en facteur H ou nommé syndrome hémolytique et urémique auto-immun chez des sujets pour lesquels l'étude génétique du FH, du FI et de MCP était normale. Les expérimentations réalisées pour étudier *in vitro* l'influence des anticorps anti-facteur H sur les fonctions de celui-ci ont montré que ces autoanticorps perturbaient spécifiquement l'activité "decay" de la C3 convertase alterne, probablement en touchant la capacité de H à se lier à C3b fixé sur une surface activatrice et non pas sa capacité à fixer C3b en phase fluide. Il a été montré que cette chaîne légère était dirigée contre un site du facteur H impliqué dans sa liaison à C3b, à l'origine de l'activation incontrôlée de la voie alterne (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006).

▪ Infections à répétition, infections à *Neisseria*

La properdine est la protéine de régulation positive de la voie alterne, qui stabilise la C3 convertase alterne. En absence de properdine, celle-ci se dissocie rapidement et ne clive plus le C3. Le déficit en properdine est une anomalie récessive liée à l'X dont la première description clinique date de 1982. Depuis, environ 100 cas de déficits en properdine ont été décrits. Une exploration fonctionnelle de la voie alterne par le test AP50 est donc nécessaire pour poser le diagnostic. Les mécanismes moléculaires des déficits en properdine sont très hétérogènes (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). Les déficits en properdine sont très fortement associés à la survenue d'infections à *N. meningitidis*, elles sont 250 fois plus fréquentes que dans la population générale. Le pronostic des infections méningococciques chez les sujets déficitaires en properdine est beaucoup plus sévère (30 à 75% de mortalité) (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006).

Ces situations pathologiques sévères nécessitent vraiment d'agir afin de réduire les effets néfastes provoqués par l'hyperactivité de système de complément.

Si l'on veut envisager d'agir sur l'activation pathologique du complément, on peut théoriquement intervenir à trois niveaux :

1. En empêchant l'activation du complément.
2. En diminuant les composants du complément.

3. Enfin, en empêchant le complément active d'agir sur les effecteurs.

En fait, il semble qu'il ya trois particularités thérapeutiques doivent être soulignées :

1. Le médicament agissant sur le complément doit être administré de manière rapprochée car le renouvellement des protéines du complément est très rapide.
2. Le médicament ne doit pas déprimer les protéines régulatrices qui sont les inhibiteurs du complément. En effet, les déficits d'un inhibiteur ont des conséquences pathologiques sérieuses.
3. Une diminution du taux des facteurs du complément eux-même va aussi entrainer des conséquences graves.

Toutes ces données doivent inciter à la plus grande prudence dans l'utilisation de médicaments agissant sur le complément.

1.2. Les glucides

Les glucides sont les composés organiques les plus largement répandus naturellement sur la terre. Ils sont compris certains les premiers biomolécules à avoir une structure déterminée, aidant donc à établir et à combler les disciplines de la chimie organique et la biochimie. (Pendarvis, 1998). Ils sont présents dans toutes les cellules vivantes. La terre et les plantes marines transforment l'énergie qui atteint la Terre sous forme de sucres, qui sont utilisés en partie pour la synthèse et la construction de divers composants et structures. (Bemiller, 2018).

Historiquement, les glucides ont été définis comme des substances avec la formule empirique générale $(CH_2O)_n$, ce qui signifie un atome de carbone (C), plus deux atomes d'hydrogène (H) et un atome d'oxygène (O) dans la même proportion que l'eau, d'où le nom de glucides, ou "hydrates de carbone" (Lim et Pullicin, 2019; Lasocka et Kennedy, 2008). La chimie de ces composés présente trois caractéristiques déterminantes: l'identité du composant (s) monomère (s), le nombre d'unités mono saccharidiques qui sont les blocs de construction de base des glucides liées entre elles (c'est-à-dire le degré de polymérisation DP) et le type de liaison (s) reliant ces unités de ces (Wanget *al.*, 2018; Lim et Pullicin, 2019; Amicucci *et al.*, 2019 ; Košťálová et Hromádková, 2019). Les glucides englobent un large éventail de molécules, qui peuvent être classées en trois groupes principales: Mono- / disaccharides (sucres), oligosaccharides et polysaccharides (Lim et Pullicin, 2019).

1.2.1. Les monosaccharides

Appelés oses, sont des molécules de glucides qui ne peuvent être brisés par hydrolyse en des molécules plus simples de glucides le terme monosaccharide indiquant qu'il s'agit d'une

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

molécule composée d'une seule unité de sucre. Les monosaccharides sont les unités monomériques des oligosaccharides et des polysaccharides (Bemiller, 2018).

Tous les monosaccharides existent sous forme des isomères de configuration "L" ou "D", lorsqu'il est représenté sous forme de chaîne droite ; Les isomères D sont les plus abondants dans la nature (Lim et Pullicin, 2019; Nogrady et Weaver, 2005). Les monosaccharides les plus abondants dans la nature, sont le glucose ou dextrose appelé aussi le sucre sanguin, le fructose et le galactose, ils contiennent 6 atomes de carbone [(CH₂O)₆] et ont tendance à exister sous forme de structures cycliques à 5 chaînons (furanose) ou à 6 chaînons (pyranose) en solution aqueuse. Un glucide qui peut être hydrolysé en deux monosaccharides est appelé un disaccharide (Nogrady et Weaver, 2005; Lim et Pullicin, 2019).

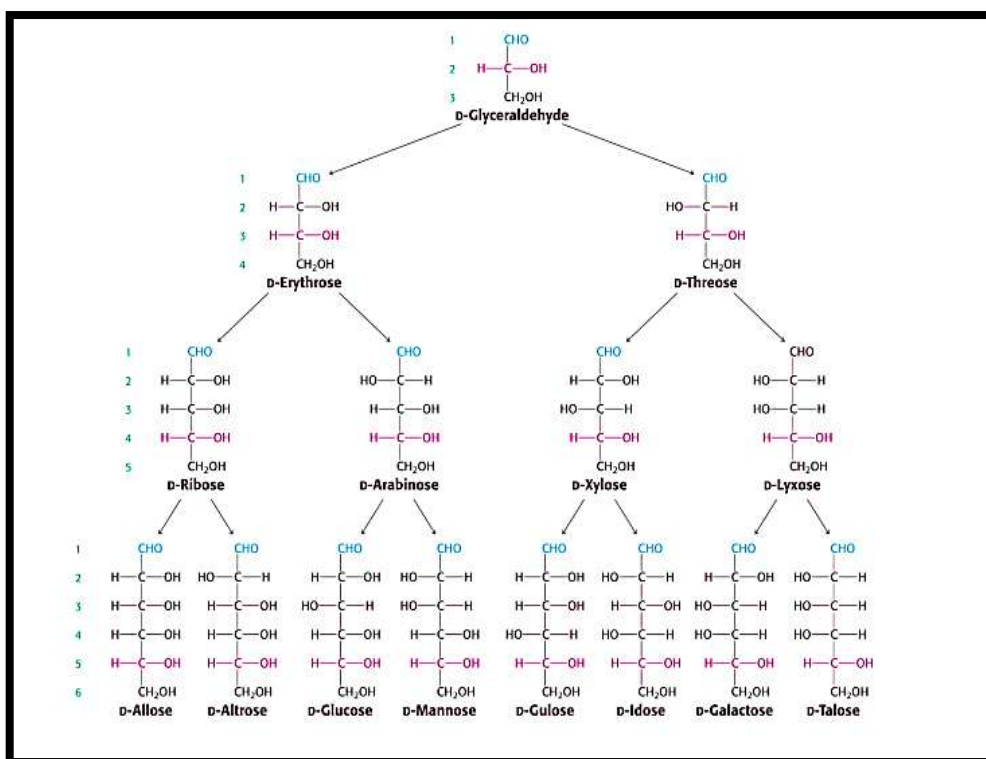


Figure 9 : les différents aldoses constitutifs des polysaccharides (Florian *et al.*, 2005).

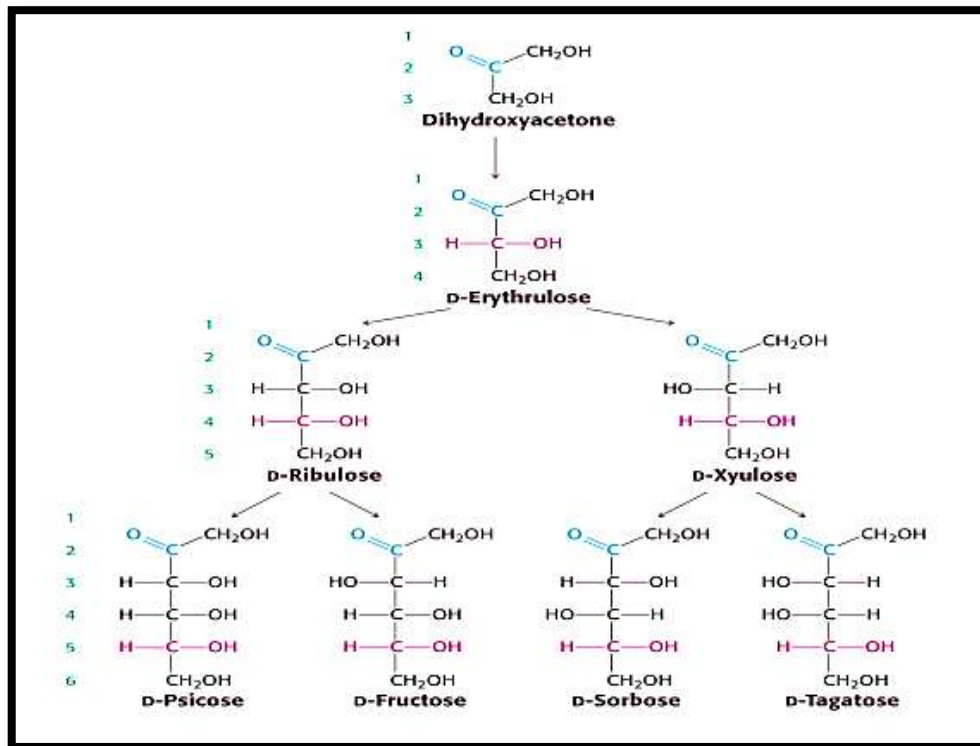


Figure 10 : les différents cétosexoses constitutifs des polysaccharides (Florian *et al.*, 2005).

1.2.2. Les oligosaccharides

Ce sont des glucides qui peuvent être hydrolysés pour former 3 à 10 unités plus simples qui sont les monosaccharides. Quelque soit leur origine (végétale, animale, algale, microbienne) les oligosaccharides représentent une large diversité des biomolécules ayant un potentiel d'application dans le domaine thérapeutique et dans la biotechnologie (Courtois, 2009; Nogrady et Weaver, 2005).

1.3. Les polysaccharides

Les polysaccharides appelés aussi les glycanes sont des groupes de macromolécules biologiques qui constituent avec les acides nucléiques et les protéines, les trois classes de biopolymères qui existent de manière évidente dans la nature. Ce sont des polymères composés de plus de 10 résidus de monosaccharides qui sont des caractéristiques structurales répétitives liés par des liaisons glycosidiques formées entre le carbone anomérique d'un monosaccharide et un groupe hydroxyle d'un autre. Ces liens sont classés à la fois selon les configurations des atomes de carbone anomériques participant à la liaison (c'est-à-dire α ou β), et selon les positions des atomes de carbone reliés par la liaison. Les nucléotides dans les acides nucléiques et les aminoacides contenus dans les protéines ne peuvent être liés que d'une seule manière, alors que les monosaccharides peuvent se connecter par différents points pour former une vaste gamme de structures divergentes de polysaccharides (Nogrady et Weaver, 2005; Xiao et

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Grinstaff, 2017; Lim et Pullicin, 2019; Mohan *et al.*, 2018). Ils peuvent être linéaires ou très ramifiés possédant des chaînes latérales ramifiées et peuvent être composés de polymères constitués de plus de 100000 résidus mono saccharidiques liés par covalence (Zong *et al.*, 2012; Amicucci *et al.*, 2019). Ces subtiles de variations de structure et de composition au sein de ces polysaccharides, sont traduites par des différences fonctionnelles, ainsi conférant de nombreux rôles essentiels dans la biologie des organismes vivants impliqués dans un large éventail de processus biologiques (Angone *et al.*, 2010; Xiao et Grinstaff, 2017; Lettow *et al.*, 2019). Les polysaccharides représentent de véritables auxiliaires indispensables au bon fonctionnement de la vie quotidienne. Un intérêt grandissant concerne leurs applications comme activateurs biologiques (Boual *et al.*, 2013). Les polysaccharides peuvent être classés en deux groupes sur la base de leur source. Les polysaccharides naturels sont obtenus à partir de divers organismes, tels que les algues, les plantes, les micro-organismes et les animaux. En revanche, les polysaccharides semi-synthétiques sont produits par la modification chimique ou enzymatique des macromolécules mères. Les polysaccharides possèdent diverses propriétés physicochimiques propriétés comprenant la gélification, la solubilité, un faible effet osmotique et propriétés de surface en fonction de leur composition et de leur architecture (Zong *et al.*, 2012).

1.3.1. Classification

Généralement, les polysaccharides peuvent être classés sur la base de plusieurs critères notamment la composition chimique en monomères, l'origine (source), l'application et la solubilité.

1.3.1.1. Selon la composition chimique en monomères

1.3.1.1.1. Homopolysaccharides

Ils ne comportent qu'un seul type de monosaccharides, c'est à dire homogènes.

- Les glucanes sont constitués de monomères de D-glucose.
- Les galactanes sont constitués de monomères de D-galactose.
- Les xylanes sont constitués de monomères de D-xylose.
- Les chitosanes sont constitués de monomères de D-glucosamine.

1.3.1.1.2. Hétéropolysaccharides

Contenant deux unités monosaccharidiques différentes ou plus. Les hétéropolysaccharides peuvent avoir différents types de liaison dans chaque unité monosaccharidique, ainsi que différents types et séquences de liaisons glycosidiques. Ils sont des molécules de haut poids

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

moléculaire contenant au moins deux paires de monosaccharides formant un motif de base polymérisé (Fabre, 1989; In Mkedder, 2012; Ramawat et Mérillon, 2015).

1.3.1.2. Selon leurs origines

Les polysaccharides peuvent être classés en deux groupes sur la base de leur source. Les polysaccharides naturels et les polysaccharides semi-synthétiques qui sont produits par la modification chimique ou enzymatique des macromolécules mères. (Zong *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015).

Les polysaccharides naturels proviennent principalement des végétaux, mais il existe aussi des sources animales, algales et bactériennes (Patterson, 2008; Kessous, 2006).

1.3.1.2.1. Polysaccharides animaux

1.3.1.2.1.1. L'héparine

Les héparines sont des mélanges hétérogènes de polysaccharides sulfatés. Il existe 2 types d'héparines: les héparines non fractionnées (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBPM). Les HNF sont extraites principalement de l'intestin de porc, leur poids moléculaire varie de 4000 à 30000 Da avec un poids moyen de 10000 à 15000 Da. Les HBPM sont obtenues à partir de l'HNF par différents procédés chimiques ou enzymatiques, leur poids moléculaire est de l'ordre de 5000 Da (Market *et al.*, 2006).

Il est produite naturellement par les basophiles et les mastocytes et en médecine, il est principalement utilisé comme anticoagulant est l'activité la mieux reconnue et la plus utilisée des activités biologiques de l'héparine, mais elle est loin d'être la seule (Molho et Tobelem, 1985; Ramawat et Mérillon, 2015; Ouyang *et al.*, 2019)

1.3.1.2.1.2. Leglycogène

Le glycogène est un polysaccharide ramifié de poids moléculaire élevé qui joue le rôle de glucide de stockage dans de nombreux tissus du corps humain et animal. Il est synthétisé et stocké principalement dans le foie et les muscles. Ce polymère a un poids moléculaire moyen de plusieurs millions avec des sous-unités de glucose liées à (1-4) et des ramifications liées à (1-6). Le glycogène possède non seulement une solubilité élevée, mais également une faible viscosité (Chen *et al.*, 2010).

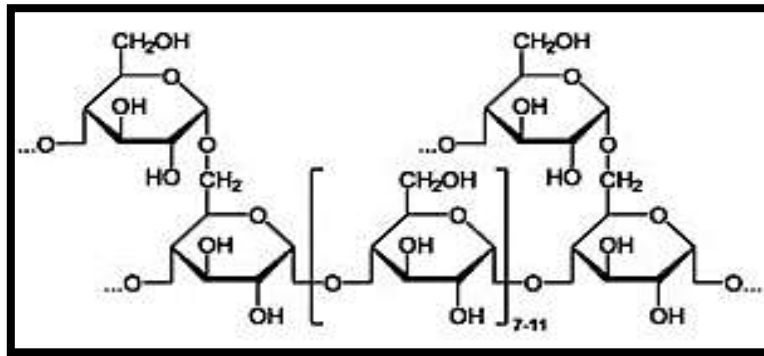


Figure11:Structure chimique du glycogène (Chouana, 2017).

1.3.1.2.2. Polysaccharides d'algue

Les polysaccharides d'algues sont probablement les molécules organiques les plus abondantes dans les océans et ont une grande biodiversité moléculaire qui est loin d'être comprise. Au cours des dernières décennies, des études ont révélé le potentiel énorme de ces macromolécules en tant qu'éliciteurs des réponses de défense des plantes. Les aspects et les progrès liés à l'utilisation des polysaccharides de macroalgues les plus étudiés tels que les carraghénanes, les fucanes, les laminarans et les ulvanes pour protéger les plantes seront abordés (El khaoutri *et al.*, 2014).

1.3.1.2.3. Polysaccharides bactériens

La synthèse de polysaccharides extracellulaires est reconnue dans certaines cultures bactériennes depuis les années 1880. Il est maintenant évident qu'un large éventail de bactéries produisent ces polymères y compris Les homopolysaccharides neutres sont également fréquents chez les bactéries. Des représentants des bactéries Gram positives et des bactéries Gram négatives produisent des lévanes (homopolymères de fructose) et une variété de glucanes, notamment de dextrans. Leur emplacement en surface, ainsi que la gamme de combinaisons de monosaccharides disponibles, de substituants non glucidiques et de types de liaison, font des polysaccharides extracellulaires d'excellents agents de diversité. En conséquence, de nombreux efforts ont été déployés pour élucider leur structure dans les bactéries pathogènes et dans les organismes entériques en particulier. Les applications commerciales des polysaccharides microbiens ont maintenant élargi le champ des informations structurelles (Chénie *et al.*, 2006).

1.3.1.2.4. Polysaccharides végétaux

La paroi végétale est une matrice extracellulaire qui délimite chaque cellule végétale. C'est un ensemble hétérogène de polysaccharides (cellulose, pectines et hémicelluloses) et de glycoprotéines ayant des structures et des compositions osidiques différentes (Angone *et al.*, 2010). Les polysaccharides végétaux ont des activités biologiques diverses, à savoir des

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

activités antitumorales , antioxydantes , antivirales, anticoagulantes , anti-compléments , anti-inflammatoires antiulcéreuses , et hypoglycémiantes (Boual *et al.*, 2015). Ces polysaccharides pariétaux peuvent être neutres ou acides, linéaires ou ramifiés par des chaînes oligosaccharidiques, ou encore substitués par des groupes méthyles ou acétyles . Les polysaccharides neutres sont représentés par les arabinogalactanes (AG), les arabinanes, les galactanes. Ces structures peuvent se retrouver associées à des glycoprotéines (AG-protéines), à un type particulier de pectine (rhamnogalacturonane-I [RG-I]) ou encore présentes sous forme libre dans des extraits solubles. β -glucanes, les glucomannanes, les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes, galactomannanes (polysaccharides hémicellulosiques) sont aussi des polysaccharides neutres de la paroi, ici de type hémicellulosique (Angone *et al.*, 2010).

1.3.1.2.4.1. Polysaccharides de réserve

Les plantes stockent des polysaccharides comme réserve. Les plus principaux sont les amidons, les fructanes et les galactomannanes.

1.3.1.2.4.1.1. Amidon

L'amidon est un polysaccharide d'origine végétale composé d'unités glucose $C_6H_{12}O_6$. Il est la principale substance glucidique de réserve des plantes supérieures. L'amidon représente une fraction pondérale importante des matières premières agricoles. On le trouve stocké dans les organes de réserve des végétaux tels que les céréales (30-70% de la matière sèche), les tubercules (60 à 90 %) et les légumineuses (25 à 50 %). L'amidon consiste en deux glucanes structurellement différents : l'amylose, polymère linéaire (c-à-d non branché) et l'amylopectine, polymère fortement branché. L'amylopectine est le constituant principal de la plupart des amidons. Il est également utilisé dans de nombreux secteurs industriels non-alimentaires : la production papetière, l'industrie pharmaceutique, cosmétique, textile etc (Wertz, 2011).

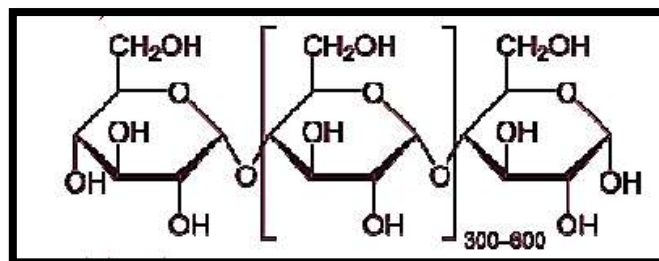


Figure12: Structure de l'amylose (Wertz, 2011).

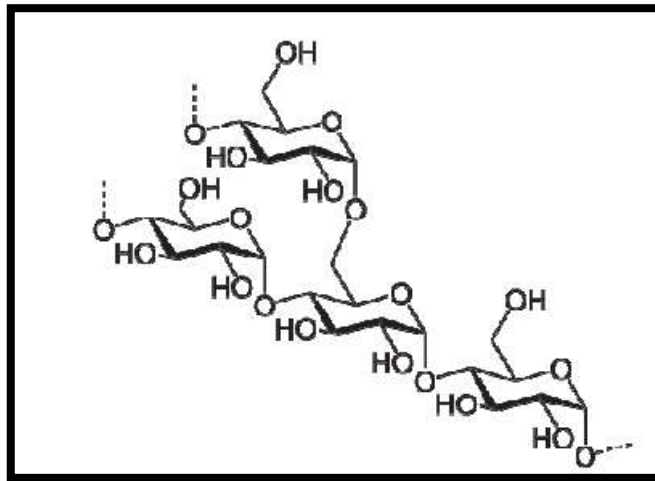


Figure 13 : Structure moléculaire de l'amylopectine (Wertz, 2011).

1.3.1.2.4.1.2.Fructane

Fructane est un nom général utilisé pour tout glucide dans lequel un ou plusieurs liens fructosyl-fructose constituent la majorité des liaisons osidiques. Les fructanes sont des polymères de fructose (oligo) linéaires ou ramifiés. Il est principalement d'origine végétale, alors que certains champignons et de nombreuses bactéries sont la principaux producteurs de levans . Des espèces de plantes contenant des fructanes se trouvent dans un certain nombre de familles mono- et dicotylédones, telles que les Liliaceae, les Amaryllidaceae, les Gramineae et les Compositae. Des parties de diverses espèces de plantes contenant du fructane sont souvent consommées sous forme de légumes (asperge, ail, poireau, oignon, artichaut, topinambour, scorzonera, racines de chicorée...etc) (Roberfroid *et al.*, 1998).

1.3.1.2.4.1.3.Galactomannanes

Les galactomannanes sont des hétéropolysaccharides présents dans l'endosperme de certaines graines d'environ 70 espèces de légumineuses,c'est seulement au 20^{ème} siècle que les galactomannanes sont devenus des produits industriels, ont de nombreuses utilisations comme agent épaississant dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie non- ,où ils exercent des fonctions de stockage, de rétention d'eau et de défense. Les galactomannanes sont solubles dans l'eau et forment des solutions aqueuses stablestrès visqueuses (Mikkonen *et al.*, 2007; Dakia *et al.*, 2010).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau 2: les propriétés moléculaires des galactomannanes des gommés de caroube, de guar, de tara et de fenugrec.

Source	Qualité	M/G(ml.g-1)	Mw(g.mol-1)	[η](ml.g-1)
<i>Ceratoniasiliqua</i> (Caroube, LBG)	Gomme brute	3,50	$1,024 \times 10^6$	710
	Gomme brute	3,60	$0,900 \times 10^6$	1 300
	Gomme brute	4,00	$2,600 \times 10^6$	-
	Gomme	2,57	-	-
<i>Caesalpiniaspinosa</i> (Tara, TG)	Gomme brute	2,95	$2,310 \times 10^6$	1 496
	Gomme	3,03	$2,530 \times 10^6$	1 646
	Gomme	3,00	$2,100 \times 10^6$	1 420
<i>TrigonellaFoenumgraecum</i> (Fenugrec, FG)	Gomme brute	1,00	-	-
	Gomme brute	1,00	-	-
	Gomme	1,00	$1,418 \times 10^6$	961

Source: (Dakia *et al.*, 2010)

1.3.1.2.4.1.3.1. Structure moléculaire des galactomannanes

Les galactomannanes consistent en un squelette de 1-4-D-mannopyranosyl sur lequel des résidus D-galactopyranosyl se greffent sur le C-6 des sites mannose. Le degré de polymérisation du squelette est compris entre 1000 et 1500 unités de mannose. Les galactomannanes se différencient par leur rapport mannose / galactose et leur schéma de distribution des résidus de galactose le long de la chaîne mannane. Cependant, la teneur en galactose (le degré de ramification exprimé aussi par le rapport mannose sur galactose M/G) de ces polymères naturels est sensiblement différent. Le rapport mannose sur galactose (M/G) (le nombre de résidus de mannose pour un résidu galactose) de la gomme de caroube (LBG) est approximativement égal à 4:1, tandis que celui de la gomme de tara (TG) est d'environ 3:1, celui de la gomme guar (GG) est d'environ 2:1 et celui de la gomme de fenugrec (FG) d'environ 1:1 (Dakia *et al.*, 2010; Mikkonen *et al.*, 2007).

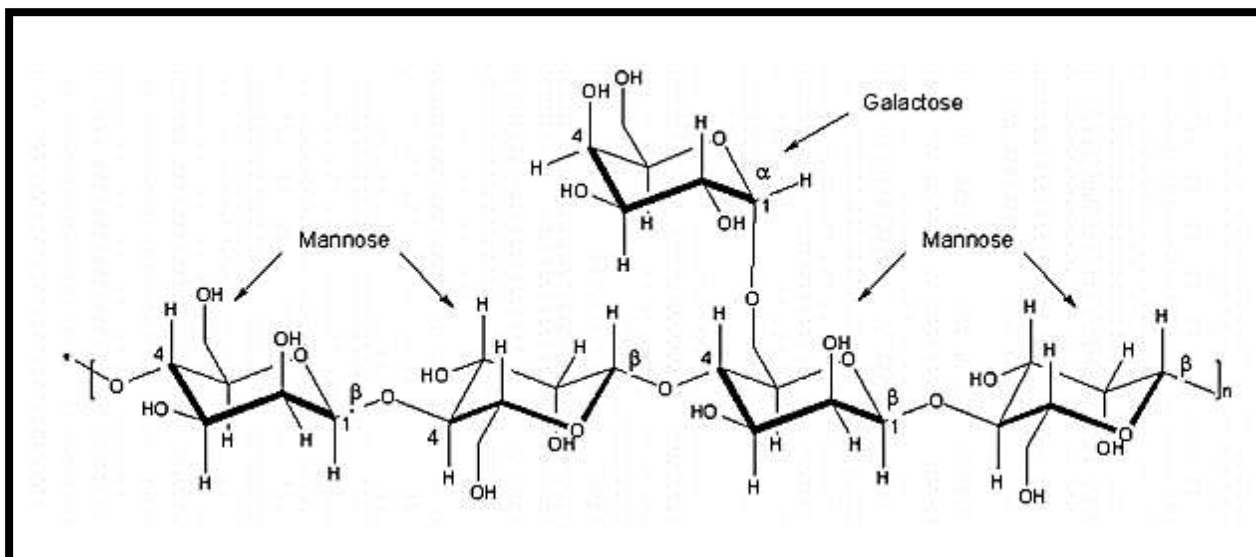


Figure14:Structure moléculaire des galactomannanes (Secouard *et al.*, 2007).

1.3.1.2.4.1.3.2 Répartition des unités galactose sur la chaîne de mannane

Il existe donc plusieurs types de galactomannanes de structure générale similaire, mais différents dans le nombre de galactose exprimé par le rapport mannose sur galactose (M/G). De plus, certains auteurs ont montré que la distribution des unités galactose sur la chaîne de mannane n'obéissait pas à une simple répartition statistique. L'utilisation d'enzyme (telle que la β -mannanase) et puis l'analyse de la composition en monosaccharides sur les produits de dégradation (oligosaccharides) a permis de proposer trois types de distribution des unités galactose : une disposition ordonnée ou régulière, une disposition aléatoire et une disposition en blocs uniformes avec 2 zones; lisses (dépourvues de ramification de galactoses) zones hérissées où les résidus galactose sont présents sur toutes les unités mannose) (Dakia *et al.*, 2010).

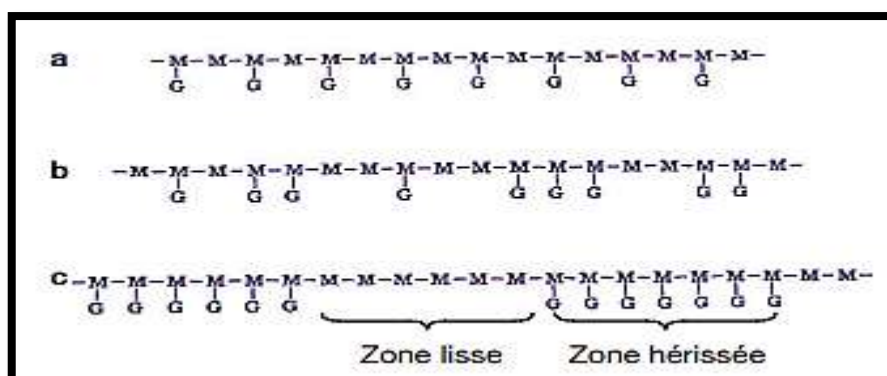


Figure15: Différents types de distribution des résidus de galactose le long de la chaîne de mannane (Dakia *et al.*, 2010).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.3.1.2.4.2 Polysaccharides de structure

La paroi végétale est donc principalement constituée de plusieurs macromolécules étroitement liées entre elles. On distingue, généralement, trois composés majoritaires :

La cellulose, les hémicellulose et les pectines.

1.3.1.2.4.2.1 Cellulose

La cellulose est le premier réseau porteur des parois primaire et secondaire (Voragen *et al.*, 2009). Elle constitue le principal constituant des parois cellulaires des végétaux où elle joue le rôle de maintien. Il s'agit d'un homopolymère linéaire formé d'unités D-glucopyranose, liées entre elles par des liaisons glycosidiques β -(1-4) (Chouana, 2017). C'est le principal composant fibrillaire des parois cellulaires des plantes et de nombreux taxons d'algues. Elle se trouve généralement dans des brins cristallins insolubles, non ramifiés, appelés microfibrilles qui résultent à la fois de la liaison hydrogène inter et intra-polymère d'hydroxyles. Ce polysaccharide est important dans l'industrie croissante des biocarburants (Ramawat et Méridon, 2015).

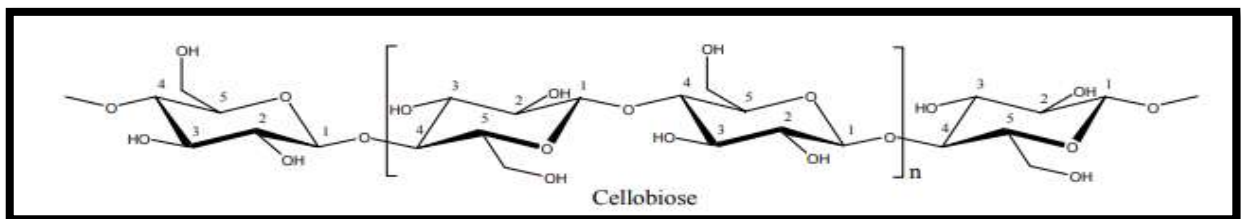


Figure16: Formule chimique de la cellulose(Chouana, 2017).

1.3.1.2.4.2.2 Hémicellulose

Les hémicelluloses sont présentes dans toutes les plantes vertes. Il y a une grande variété de types structuraux d'hémicelluloses. Elles constituent un groupe de polysaccharides complexes qui se caractérisent par leur solubilité dans des solutions alcalines (par exemple KOH 1M) et leur insolubilité dans l'eau. Les hémicelluloses sont définies structurellement comme des polysaccharides dont le squelette est composé de résidus β -(1-4)-D-pyranose. Elles sont divisées en quatre groupes : xylanes, mannanes, β -glucanes mixtes et xyloglucanes. Les xylanes sont les principaux composés hémicellulosiques de la paroi secondaire, ils représentent environ 20–30 % de biomasse des plantes dicotylédones (Angone *et al.*, 2010) .

1.3.1.2.4.2.3 Pectines

Le terme « pectines » fait référence à un ensemble de polysaccharides complexes qui entrent dans la composition des parois cellulaires de la plupart des végétaux supérieurs ; ils sont des substances d'origine végétale. On retrouve principalement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des plantes supérieures (Agnan *et al.*, 2011).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Certains de ces polysaccharides pectiques sont acides ou neutres (Angone *et al.*, 2010). Les pectines sont abondantes dans les fruits et les légumes (mentionnés dans le tableau 4) et évoluent avec la maturation des tissus. Bien qu'elles puissent être extraites d'un grand nombre de végétaux, les principales sources industrielles de pectines sont les marcs de pomme et les écorces de citron et d'orange. Les pectines présentent des propriétés physico-chimiques spécifiques du fait de leur caractère polyélectrolyte. La structure fine de la pectique des polysaccharides régit le(s) rôle(s) biologique(s) de ces molécules (Caffall *et al.*, 2009). Les polysaccharides pectiques sont synthétisés dans la lumière de Golgi et transportés à la surface des cellules végétales (Ramawat et Mérillon, 2015).

Tableau 3: Teneurs en substances pectiques de quelques végétaux

Fruit	Teneur en substances pectiques (% du poids frais)
Pomme (<i>Malus spp.</i>)	0,5-1,6
Marc de pomme	1,5-2,5
Banane (<i>Musa acuminata</i>)	0,7-1,2
Pulpe de betterave (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0
Carambole (<i>Averrhoa carambola</i>)	0,66
Carotte (<i>Daucus carota</i>)	0,2-0,5
Goyave (<i>Psidium guajava</i>)	0,77-0,99
Pulpe de citron (<i>Citrus lemon</i>)	2,5-4,0
Litchi (<i>Litchi chinesis</i>)	0,42
Mangue (<i>Mangifera indica</i>)	0,26-0,42
Zeste d'orange (<i>Citrus sinensis</i>)	3,5-5,5
Papaye (<i>Carcia papaya</i>)	0,66-1,0
Fruit de la passion (<i>Passiflora edulis</i>)	0,5
Péricarpe du fruit de la passion	2,1-3,0
Ananas (<i>Ananas comosus</i>)	0,04-0,13
Fraise (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,6-0,7
Tamarin (<i>Tamarindus indica</i>)	1,71

Source: (Agnan *et al.*, 2011)

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Les pectines sont des hétéropolysaccharides caractérisés par une forte teneur en acide galacturonique (GalA), monomères liés entre eux par des liaisons α -(1-4) et partiellement acétylés ou estérifiés par des groupements méthyles. Les 4 classes de structure des polysaccharides pectiques comprennent l'homogalacturonane (HG), le xylogalacturonane (XGA), l'apiogalacturane (AGA), le rhamnogalacturonane I (RG-I), et rhamnogalacturonane II (RG-II) (Caffall *et al.*, 2009; Agnan *et al.*, 2011).

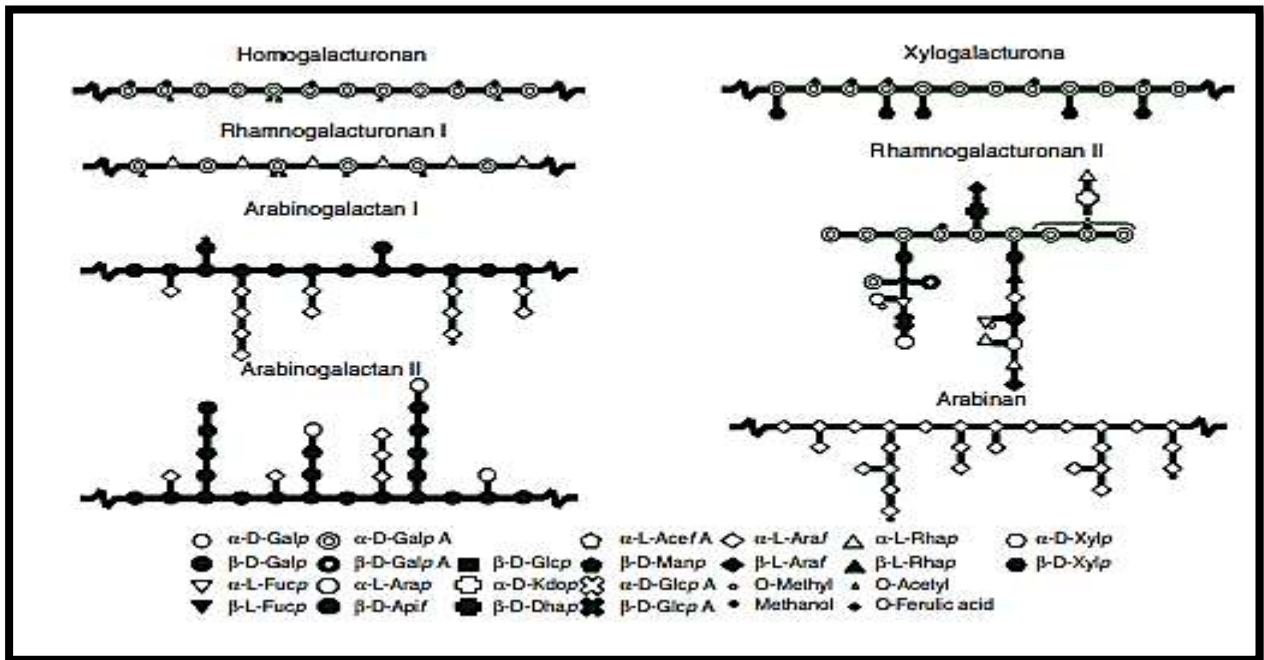


Figure 17: Représentation schématique des éléments structuraux de pectine (Voragen *et al.*, 2009).

1.3.1.2.4.2.3.1. Homogalacturonane

Les homogalacturonanes (HG) est le type de pectine le plus répandu. Ils représentent 57 à 69 % de la pectine. Ce sont des polymères linéaires constitués uniquement d'acides D-galacturoniques reliés entre eux par des liaisons α -(1-4) et dont les fonctions carboxyliques et alcools peuvent être estérifiées. Elles forment la zone lisse des pectines. La méthylestérification des régions homogalacturonanes détermine dans une large mesure l'application industrielle des pectines et leur capacité d'interaction. En effet, de nombreuses propriétés et fonctions biologiques des pectines sont déterminées par une interaction ionique entre régions homogalacturonanes (Agnan *et al.*, 2011 ; Ramawat et Mérillon, 2015).

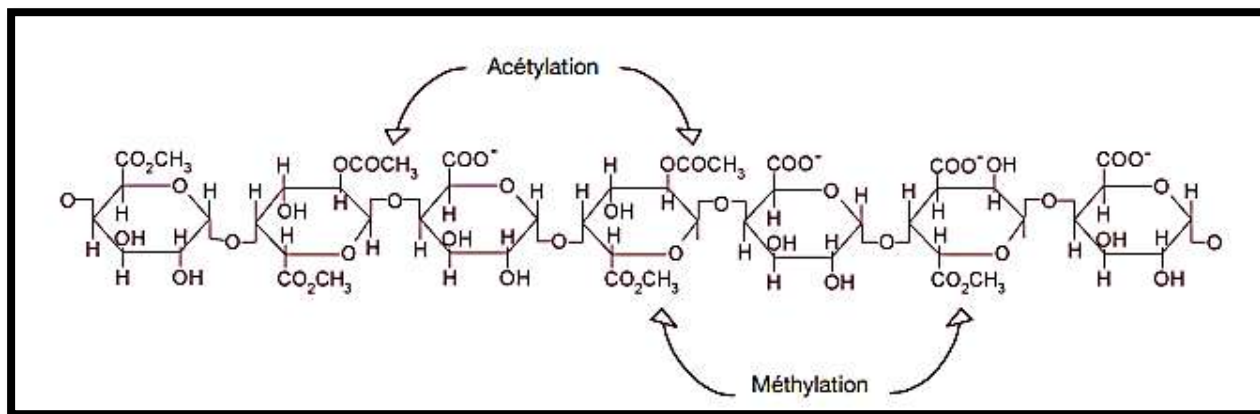


Figure 18: Structure primaire d'un homogalacturonane (Agnan *et al.*, 2011).

1.3.1.2.4.2.3.2. Xylogalacturonane

Le xylogalacturonane (XGA) est un groupe HG substitué par des résidus de D-xylose au niveau du C-3 des résidus du squelette de GalA. Le XGA caractérisé dans des extraits pectiques de l'herbier marin de Zosteraceae constitué de HG substitué par un xaccharose disaccharide (Xylp- (1-2) -Xylp- (1-3) -GalpA. Le XGA isolé à partir de polysaccharides solubles dans le soja (Glycine max) a donné un fragment de résidus GalA liés en (1-4) substitués en 0-3 avec des chaînes d'environ un à sept résidus de xylose liés en $\beta(1-4)$, dont le premier est fréquemment ramifié au niveau de la position O-2 par un résidu de xylose supplémentaire. Comme le fragment isolé de soja n'a pas été observé précédemment dans les parois des cellules végétales, il est susceptible de constituer un composant relativement mineur de la paroi ou d'être une structure spécifique aux parois du soja et à des espèces étroitement apparentées. La structure de polysaccharide XGA la plus abondante, qui a été observée chez plusieurs espèces, est le squelette du galacturonane substitué au niveau O-3 par Xyl et par Xyl ramifiés au O-2 par un autre résidu de Xyl (Caffall *et al.*, 2009).

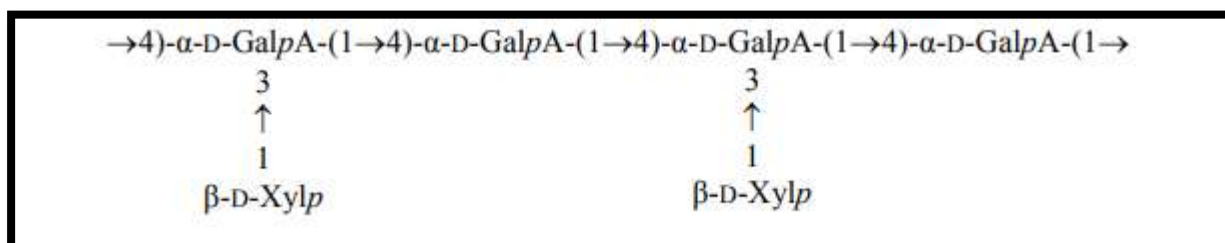


Figure 19: Structure de Xylogalacturonan (Chouana, 2017).

1.3.1.2.4.2.3.3. Arabinogalactan I

Les AGI sont composées d'un squelette principal de β -D-galp lié par (1-4) lié avec de courtes chaînes latérales d' α -araf lié par (1-5) lié en position O-3. D'autres résidus tels que le galactose, l'arabinose et l'acide férulique pourraient également être trouvés, par exemple dans

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

certaines tissus de betterave à sucre. Globalement, l'AGI peut être isolé de diverses parois primaires de tissus de plantes dicotylédones, notamment de nombreux fruits (Ramawat et Méryllon, 2015).

1.3.1.2.4.2.3.4. Arabinogalactan II

Les AGII sont des polysaccharides hautement complexes souvent associés à des protéines et décrits comme des protéoglycane bien connus de l'arabinogalactane (AG). Ces protéoglycane sont largement distribués dans les plantes et constituent l'une des macromolécules naturelles les plus complexes. Les AGII peuvent être extraits de diverses plantes, ainsi que de polymères pectiques liés par covalence. Les arabinogalactanes de type II sont constitués de résidus de (1-3) - et (1-6) - β -D-galp. Des chaînes latérales courtes d'unités (1-6) - β -Dgalp comprenant une à trois résidus de longueur sont également présentes. Les résidus de terminal α -L-araf sont souvent liés aux positions O-3 et O-6 de cette épine dorsale (Ramawat et Méryllon, 2015).

1.3.1.2.4.2.3.5. Rhamnogalacturonan I

L'épine dorsale de la structure du rhamnogalacturonane I (RG-I) a des unités répétitives de [α -D-GalpA-1-2- α -L-Rhap-1-4] $_n$ caractérisées à partir de parois en sycamore cultivées en suspension (*A. pseudoplatanus*) et les polysaccharides solubles de soja. On trouve de grandes quantités relatives de RG-I dans le mucilage extrudé à partir des graines d'espèces myxospermes et dans la paroi primaire et la lamelle moyenne de la pomme de terre (*S. tuberosum*). Les parois du sycamore cultivé en suspension ont 7% de RG-I, alors que les parois des tubercules de pomme de terre ont 36% de polysaccharides RG-I à poids sec. On prévoit que la conformation étendue du squelette du RG-I prendra celle d'une triple hélice. Le RG-I isolé du mucilage de la graine est largement non ramifiés, alors que RG-I isolé des murs est ramifié à environ la moitié des résidus de rhamnose en position C-4 par les chaînes latérales de l'arabinane, du galactane ou de l'arabinogalactane réglementé (Caffall *et al*, 2009).

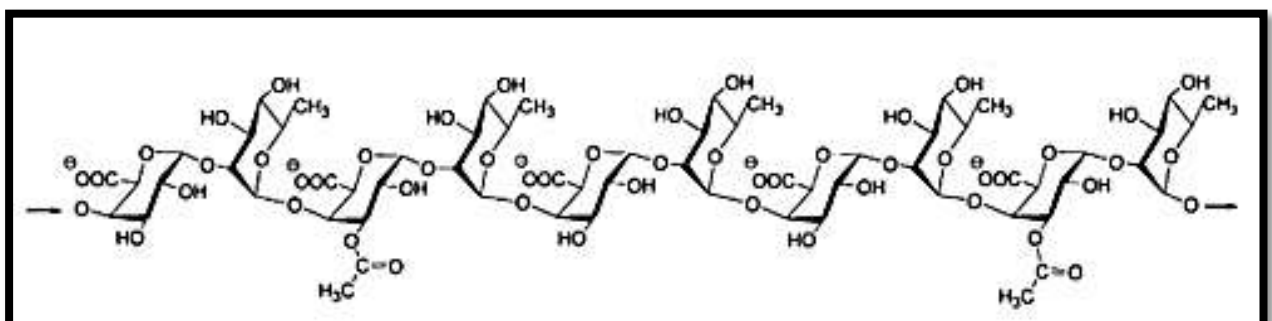


Figure20: Structure des RG-I (Chouana, 2017).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.3.1.2.4.2.3.6. Rhamnogalacturonan II

Le rhamnogalacturonane II (RGII) est une structure hautement conservée dans le règne végétal et peut être libéré par l'action de l'endopolygalacturonase. La structure se caractérise par une région distincte dans HG, contenant des amas de quatre chaînes latérales différentes avec des résidus de sucre très particuliers, tels que l'aciose, l'acide acérique, l'acide 3-désoxy-lyxo-2-heptulosarique (DHA) et le 3-désoxy-manno-2-acide octulosonique (KDO). Ces chaînes latérales sont liées à un fragment HG d'environ neuf résidus GalA, dont certains sont estérifiés par un méthyle. La structure de RGII semble être hautement conservée dans le règne végétal. RGII peut se complexer avec le bore, formant un ester borate – diol, capable de réticuler deux molécules de HG. Seuls les résidus apiofuranosyle des chaînes latérales contenant du 2-O-méthyl-D-xylose dans chacune des sous-unités du dimère participent à la réticulation (Voragen *et al.*, 2009).

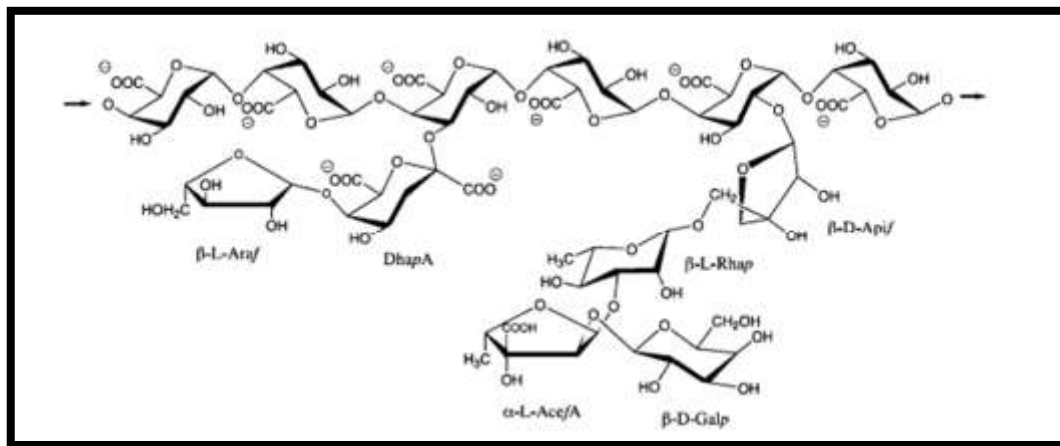


Figure21: Structure des RG-II (Chouana, 2017).

1.3.1.2.4.2.3.7. Applications des pectines

Les pectines utilisées depuis longtemps comme agents de texture, gélifiants, stabilisants et épaississants, les pectines sont une source d'ingrédients pour des aliments santé (Agnan *et al.*, 2011).

Ces biopolymères émergents trouvent des applications dans des domaines divers, alimentaires ou non alimentaires. Leurs principales applications comprennent la fonction élicitrice des plantes, la protection contre le cancer du colon, la stimulation de la croissance de bactéries bénéfiques dans le colon (prébiotiques), l'inhibition de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales, mais aussi l'induction d'une mort par apoptose des cellules d'adénocarcinome du colon (Agnan *et al.*, 2011).

1.3.2. Les activités biologiques des polysaccharides

Les polysaccharides sont abondants dans la nature et constituent le constituant principal de la paroi cellulaire de plantes (par exemple, cellulose ou pectine). Les extraits de polysaccharides naturels à base de plantes démontrent une hétérogénéité dans les caractéristiques structurales en fonction du génotype de la plante et du stade de maturation. Ces caractéristiques structurales confèrent aux polysaccharides une diversité des propriétés fonctionnelles bioactives, physicochimiques et rhéologiques. Ces dernières dépendent non seulement de leur composition chimique, masse molaire, caractéristiques de ramification et groupes fonctionnels mais également de la méthode et les conditions d'extraction et de purification qui produisent ensuite des biopolymères avec des propriétés uniques. La procédure d'extraction utilisée influence aussi sur le rendement, la qualité, la structure des polysaccharides obtenus. Ils jouent un rôle clé dans l'industrie alimentaire impliqué dans la structuration et la stabilisation des systèmes alimentaires grâce à leurs propriétés fonctionnelles gélifiantes, épaississantes, stabilisatrices de surface. Ils peuvent se comporter comme de bons bioprotecteurs et des additifs hydratants pour les aliments et la clarification des boissons. Ils sont exploités aussi dans l'industrie pharmaceutique comme une matrice hydrophile pour les comprimés et également dans l'industrie cosmétique en raison de leurs précieuses propriétés fonctionnelles. En outre, le rôle crucial le plus intéressant des polysaccharides surtout végétaux réside dans leur applications très vastes dans le domaine biologique et thérapeutique, grâce aux plusieurs activités biologiques, y compris antidiabétique, antitumorale, prébiotiques, antifatigue, anti-oxydante, antiglycation, anti-cancérogène (antiprolifératif), anti-âge, anti-hypoglycémique, hypoglycémique, hypolipidémique, anti-thrombotique, anti-coagulante et surtout les activités anti-inflammatoires et immunomodulatrices et cette dernière que nous essayerons de la prouver à travers notre travail (Schmitt *et al.*, 1998; Bedir *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2018; Mzougchi *et al.*, 2018; Kpodo *et al.*, 2019; Olacehinde *et al.*, 2019; Morales-Horanedez *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2019).

1.3.2.1. L'activité immunomodulatrice

Avec les progrès récents dans la compréhension de la manière dont les cellules communiquent avec leurs autres fonctions de vecteur, il est devenu possible de concevoir des stratégies pour manipuler ces voies de signalisation afin d'influer sur les réponses de l'hôte. Le fait que certains composés améliorent ou suppriment les réponses immunitaires peut dépendre d'un certain nombre de facteurs, notamment la dose, la voie d'administration et le moment d'administration du composé en question. Le type d'activité de ces composés peut également dépendre de leur mécanisme d'action ou du site de l'activité. La stratégie de base de

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

l'immunomodulation consiste à identifier les aspects de la réponse de l'hôte qui peuvent être améliorés ou supprimés de manière à augmenter ou compléter une réponse immunitaire souhaitée. Cette approche, qui devrait permettre à l'hôte de mieux se défendre contre les micro-organismes envahisseurs au cours de l'infection (Tzianabos, 2000).

Les composés qui sont capables d'interagir avec le système immunitaire pour réguler positivement ou négativement les aspects spécifiques de la réponse de l'hôte peuvent être classés comme des immunomodulateurs ou des modificateurs de la réponse biologique. L'utilisation clinique potentielle des immunomodulateurs polysaccharidiques a été illustrée par des études, et ils sont les candidats idéaux pour des traitements à action immunomodulatrice, anti-tumorale et cicatrisante car la plupart de ces polysaccharides surtout ceux dérivés de plantes supérieures sont relativement non toxiques et ne provoquent pas d'effets secondaires significatifs. Ce sont des véritables auxiliaires indispensables au bon fonctionnement de la vie quotidienne. Un intérêt grandissant concerne leurs applications comme activateurs biologiques (Boual et al., 2012). Bien qu'un certain nombre d'immunomodulateurs polysaccharidiques aient été identifiés et ont été examinés en détail, où des études de structure-fonction et de mécanisme d'action ont été réalisées. Le mécanisme de base de l'immunostimulant, l'anti-tumoral, le bactéricide et d'autres effets thérapeutiques des polysaccharides végétaux, semble survenir via la lutte contre les infections opportunistes dans les situations, comme le sida, qui fragilisent le système immunitaire c'est-à-dire des effets protecteurs et l'augmentation de l'immunité et de la résistance chez les patients soumis à la chimiothérapie, la stimulation des macrophages et la modulation du système du complément (Tzianabos, 2000; Schebetkin et Quinn, 2006; Angone *et al.*, 2010).

1.3.2.1.1.L'activité anti complémentaire

Le système du complément peut être activé par trois voies distinctes, notamment la voie classique (CP), la voie alternative (AP) et la voie des lectines (LP). L'activation appropriée de système du complément humain joue un rôle important dans la défense de l'hôte contre les organismes envahissants étrangers tels que les bactéries, les champignons et les virus. Par ailleurs, une activation aberrante et inappropriée du système de complément dans les tissus cibles peut contribuer ou évoquer des réactions pathologiques dans diverses maladies auto-immunes, inflammatoires, ischémiques et dégénératives, par exemple diverses anémies hémolytiques, des maladies dermatologiques, la polyarthrite rhumatoïde, la goutte et les infections microbiennes. Par conséquent, la modulation d'activité complémentaire par l'inhibition de l'activation excessive du complément peut être importante, et représente une stratégie thérapeutique possible pour le traitement de ces maladies. (Yamagishi *et al.*, 2003; Wang *et al.*,

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

2016; Du *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017) De nombreuses molécules synthétiques, notamment le sulfate de dextran, le mésilate de nafamostat et la compstatine inhibent l'activation du système du complément. Il existe de nombreuses recherches sur les inhibiteurs du complément d'origine naturelle isolés à partir de produits d'origine animale, microbienne et végétale, tels que l'acide phénolique, les protéines, les flavonoïdes, les stéroïdes et les polysaccharides (Jin *et al.*, 2015).

CHAPITRE 2:
MATERIEL ET METHODES

2.1.Matériel

2.1.1. Appareillages et petits matériels

Un certain nombre d'appareillages et petits matériels spécifiques a été utilisé au laboratoire dans le cadre de notre étude représentés dans :

- Centrifugeuse réfrigérée.
- Ultrason.
- Deux incubateurs l'un réglé à 37°C et l'autre à 56°C.
- Bain marie.
- Balance électronique.
- Balance de précision.
- pH mètre/Température.
- Rotateur.
- Plaque chauffante.
- Pieds à coulisse électronique.
- Micropipettes, pipettes graduées, poire d'aspiration, béchers, erlenmayers, fioles jaugées, tubes d'épindoff, boîtes pétri, éprouvettes, entonnoirs, spatule, para film...etc.

2.1.2. Produits chimiques, réactifs et matériel biologique

- Les tampons:

Tampon PBS(Phosphate Buffer Salin) /EGTA (Acide éthylène glycol tétra acétique) avec un pH neutre.

Tampon PBS / EGTA/ Mg⁺⁺ (solution saline tamponnée (PBS) avec MgCl₂ et EGTA d'un pH neutre.

- Gel d'agarose.
- Le sang de poulet (Source des érythrocytes qui sont ensuite traitées avec l'ACD (anticoagulant) 20 % (v/v) et stockées à une température de 4 C°).
- Echantillon du Plasma humain normal (PHN) prélevé d'un donneur adulte sain.
- Les (4) extraits polysaccharidiques issus de la plante d'*Astragalus gombo* (voir l'annexe 3): **PS1**, **PS2** etissus des tiges, **PSR** issu des racineset **PSG** issu des grains de la plante.

2.2. Méthodes

Notre travail a été réalisé au sein de laboratoire d'immunologie de la faculté de medecine à l'université Kasdi Merbah-Ouargla qui porte l'objectif d'étudier l'activité anti-complémentaire des extraits polysaccharidiques. toutes les mesures de ce travail ont été refaites 2 fois avec des constante de vaiabilité ne dépassent pas 10 % (sauf pour la concentration réactionnelle 0,156 mg/ml de la faction PS1) (l'annexe 7).

Le protocole d'extraction décrit et réalisé par Chouana. (2017), a permis d'obtenir les (4) fractions polysaccharidiques:

- La fraction **PS1** issue d'une extraction aqueuse dans le NaOH.
- La fraction **PS2** issue d'une extraction aqueuse dans l'HCl.
- La fraction **PSR** extraite à partir des racines de la plante par une solution aqueuse neutre de'extraction.
- La fraction **PSG** extraite à partir des graines de la plante par une extraction aqueuse neutre.

2.2.1. Préparation des 4 solutions initiales à partir des (4) extraits polysaccharidiques

Les 4 solutions polysaccharidiques initiales sont préparées par la solubilisation de chaque extrait polysaccharidique (**PSG, PS2, PS1, PSR**) dans le tampon PBS / EGTA/ Mg⁺⁺ comme décrit dans le tableau 4, qui est le tampon d'activation de la voie alterne du complément et en offrant le temps nécessaire dans le rotateur et même en utilisant l'ultrason, pour avoir des solutions polysaccharidiques bien solubilisées et homogènes.

Tableau 4: les 4 solutions polysacchridiques initiales.

Solution	PSG	PS2	PS3	PSR
Concentration (mg/ml)	25	10	10	12,5

2.2.2. Préparation des 4 solutions mères

D'après ces solutions polysaccharidiques initiales concentrées, on prépare des solutions moins concentrées, qui sont les solutions mères à une concentration de 2mg/ml, obtenues par dilutions par le tampon PBS / EGTA / Mg⁺⁺ (Wang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Le tableau

Chapire 2 : Materiel et méthodes

ci-dessous présente les volumes nécessaires pris à partir des solutions initiales (SI) et de tampon PBS / EGTA / Mg⁺⁺ pour préparer les (4) solutions mères (SM).

Tableau 5:la préparation des 4 solutions mères.

Les solutions initiales	PSG	PS1	PS2	PSR
Concentration de SI (mg/ml)	25	10	10	12,5
Volume de SI (µl)	80	200	200	160
Volume de tampon (µl)	920	800	800	840
Concentration de SM (mg/ml)	2	2	2	2

2.2.3.Préparation des dilutions de chaque solution mère

A partir de ces solutions mères préparées d'une concentration de 2mg/ml on réalise une série de 3 dilutions différentes (1 / 0,5 / 0,25mg/ml), effectuées également par le même tampon PBS / EGTA/Mg⁺⁺, pour chaque solution mère. (Wang *et al.*, 2016;Wang *et al.*, 2017).

Le tableau ci-dessous représente la préparation des dilutions qui a été réalisée.

Tableau6: la préparation des 3 dilutions de chaque solution mère.

Concentration (mg/ml)	1	0,5	0,25
Volume de solution mère(µl)	500	250	125
Volume de tampon PBS/ EGTA / Mg ⁺⁺ (µl)	500	750	875

2.2.4. L'étude de l'activité anti complémentaire des (4) fractions polysaccharidiques par la technique hémolytique AP100

Une dérégulation de la voie alterne du complément constitue l'un des facteurs de risque essentiels du développement de certains mécanismes physiopathologiques capable de développer des pathologies d'une grande diversité clinique. Dans cette mise au point, nous revenons rapidement sur les différentes voies d'activation du complément et leurs mécanismes de régulation par des dosages fonctionnels spécifiques, puis nous décrivons les différentes situations pathologiques associées au complément en développant les hypothèses des mécanismes physiopathologiques mis en cause. Une exploration du système du complément est particulièrement nécessaire dans un contexte de maladies auto-immunes, de certaines pathologies

Chapire 2 : Materiel et méthodes

rénales, d'infections à répétition (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). Une évaluation précise de l'activité du complément activé suivant la voie alterne est un outil indispensable également pour approcher des différents mécanismes qui participent à l'inflammation dans les phénomènes de défense de l'organisme (Boulardet Bencharif,1984). Cette exploration fonctionnelle permet d'avancer dans la compréhension du rôle joué par le complément dans les processus physiopathologiques de ces maladies et dans la mise en place de thérapeutiques mieux ciblées (Dragon-durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). L'exploration du système de complément est effectuée à l'aide de techniques hémolytiques qui explorent les activités fonctionnelles et de techniques immunochimiques qui quantifient les protéines (Frémeaux-Bacchi *et al.*, 2012).

La technique d'AP100 est une technique hémolytique effectuée sur gel et utilise les érythrocytes de poulet, afin d'explorer la fonction de la voie alterne de complément par la mesure de la lyse d'érythrocytes de poulet en présence de sérum humain normal (PHN).

Le dosage d'AP100 apprécie l'activité fonctionnelle globale de la voie alterne et de la voie finale commune sur des boites d'agarose-poulet érythrocytaire, en mesurant la lyse d'érythrocytes de poulet (globules rouges) en présence du plasma à tester contenant les éléments de complément dans des conditions expérimentales définies où seulement la voie alterne est initiée et étudiée. D'une manière globale, les dosages hémolytiques y compris l'AP100 permettent de mesurer l'activité fonctionnelle des protéines du complément (Frémeaux-Bacchi *et al.*, 2012). Les tests hémolytiques consistent à déterminer la quantité de plasma du patient capable d'entraîner un certain taux de lyse d'un nombre donné de globules rouges estimé à partir des zones d'hémolyse après la diffusion radiale (Frémeaux-Bacchi *et al.*, 2012). En ce qui concerne l'AP100, le taux de lyse des érythrocytes par les éléments de la voie alterne du complément est de 100 % comme le nom l'indique.

Le dosage d'AP100 nous permet pas d'étudier l'intégrité fonctionnelle de la voie alterne du complément seulement, mais il nous offre également une opportunité à étudier et évaluer la capacité de certains bio polymères biologiquement actifs notamment les polysaccharides, à moduler la voie alterne de système du complément, ce ci est l'objectif de notre travail du fin d'étude.

2.2.5.Mode opératoire de la technique hémolytique AP100:

La technique hémolytique fonctionnelle AP100 est une procédure rigoureuse renfermant un certain nombre d'étapes, cités ci-dessous :

1/ Préparation du tampon EGTA/Mg⁺⁺

Dans un tube stérile mettre 9,8 ml de tampon (EGTA) et le mettre dans un incubateur à 56°C.

2/ Préparation des érythrocytes du poulet

Cette étape permet d'obtenir les érythrocytes de poulet à partir du sang. Avec une micropipette prendre 200 μ l du sang et la mettre au fond d'un tube stérile comme indiqué dans la photo 1. Centrifuger le sang du poulet à 2500 tours/min pendant 10 min, Puis lavez cette quantité (le culot obtenu après centrifugation) 2 fois avec 2,1 ml du tampon de lavage. Après lavage ajouter 2,1 ml de tampon interne (tampon de lavage) et mettre la suspension cellulaire au bain marie à température de 45 °C.



Photo 1: la centrifugation du sang de poulet pour l'obtention des érythrocytes.



Photo 2: Lavage (2) fois des érythrocytes de poulet par le tampon de PBS/EGTA/Mg⁺⁺.

3/ Préparation du gel d'agarose

Avec la balance mesurer 0,24 g de poudre de gel d'agarose. Ensuite ajouter 12,25 ml de tampon de lavage (85°C). Ramener la température du gel à 45°C en utilisant la sonde de pH/température. La photo3 indique cette étape.



Photo 3:Préparation du gel d'agarose.

4/ Préparation des boites d'AP100

Mélanger le tampon EGTA/Mg⁺⁺ (9,8 ml) et le gel précédemment préparé, puis ajouter la suspension de globules rouge du poulet préparée précédemment à 45 °C, et mélanger le tous doucement. Couler le gel dans les boites de pétri, laisser refroidir à 4 °C pendant 10 min .En utilisant la pipette pasteur, creuser soigneusement la boite à fin d'obtenir des puits (8 puits) espacés de 1.5 cm. Enfin, les boites seront conservées à 4°C au réfrigérateur.la photo 4 indique l'étape.



Photo 4:la préparation des boites d'agarose érythrocytaires (AP100).

2.2.6.l'utilisation de la technique hémolytique AP100 pour l'étude d'activité anti-complément des (4) fractions polysaccharidiques:

L'activité anti-complément, fait référence à l'inhibition de l'hémolyse observée en raison de l'interaction entre les protéines du complément et le polysaccharide. Le test ne fait pas de distinction entre l'activation et l'inhibition du système du complément, mais il montre que le système du complément, est affecté par la présence de certains polysaccharides. Elle est utilisée en essai préliminaire pour la recherche de polysaccharides biologiquement actifs (Samuelson *et al.*,1998). Les substances qui inhibent l'hémolyse font référence aux substances anti complémentaires (Yamagishi *et al.*, 2003).

L'activité anti-complémentaire a été mesurée sur la base de la consommation de complément et du degré de lyse des érythrocytes par la voie alternative du complément, selon la méthode de Klerx *et al* (Boual *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017).

La contribution à l'étude de l'activité anticomplément de nos (4) fractions polysaccharidiques **PSG, PS2, PS1**et **PSR** par la technique hémolytique AP100 par leur incubation sur boites de Pétri, est précédée par 3 étapes essentiels qui sont :

1. Dilution du plasma humain normal (PHN)

Le contrôle négatif représenté par le plasma humain normal (PHN) prélevé à partir d'un donneur adulte en bonne santé (sain) comme source de complément, est dilué à 1:6 par le tampon PBS / EGTA/Mg⁺⁺, cette dilution du PHN a été choisie pour obtenir une lyse

Chapire 2 : Materiel et méthodes

maximale des érythrocytes en absence d'inhibiteurs de complément en se basant sur des études précédentes. (Boual *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017).

2. Préparation de contrôle positif: l'héparine

L'héparine est un glycosaminoglycane polyanionique, utilisé comme contrôle positif en raison de ses fortes propriétés anti complémentaires *in vitro*, qu'elle le rend un polysaccharide très puissant pour l'inhibition d'activation du système du complément. La solution d'héparine utilisée pour notre étude est d'une concentration de 0,045 mg/ml et qui est sa dose inhibitrice maximale de la voie alterne du complément selon Wang *et al* 2016. La solution de contrôle positif est préparée par dilution d'une solution initiale de 50 mg/ml en utilisant le tampon (PBS / EGTA/Mg⁺⁺).

3. La pré incubation

Après que chaque extrait polysaccharidique ainsi que l'héparine (le contrôle positif) ont été dissous dans le tampon d'activation de la voie alterne du complément PBS /EGTA/Mg⁺⁺ et différentes dilutions des solutions polysaccharidiques ont été préparées précisément par ce tampon (1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml), ensuite il ya une étape de pré-incubation des dilutions de chaque échantillon (150 μ L) avec du NHS (Normal human serum) ou PHN dilué à 1:6 (150 μ L) qui ont été ajoutés aux puits sur une microplaque et incubés dans un incubateur à 37 ° C pendant 10 min comme la photo5 indique. (Diallo *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).



Photo 5: Le dépôt du mélange dans les puits du microplaque à l'aide d'une micropipette.



Photo 6:La préincubation de la microplaque à l'interieur de l'incubateur 37 C° pendant 10 min.

L'incubation

L'étude de l'activité anti complément des 4 fractions polysaccharidiques est réalisée en exploitant des boites de Pétri d'AP100 déjà préparées en suivant la procédure précédemment mentionnée contenant 7 puits périphériques et un huitième central pour l'incubation de:

- 80µl de chaqu'une des (3)dilutions de chaque solution polysaccharidique (1mg/ml, 0,5mg/ml et 0 ,25mg/ml), réservant chacune un puit individuel sur la boite de Pétri.
- 80µl du contrôle positif qui est l'héparine (0,045mg/ml) réservant un autre puit individuel.
- 80µl de la solution du PHN qui représente le contrôle négatif diluée à 1:6 réservant le puit central de boite.

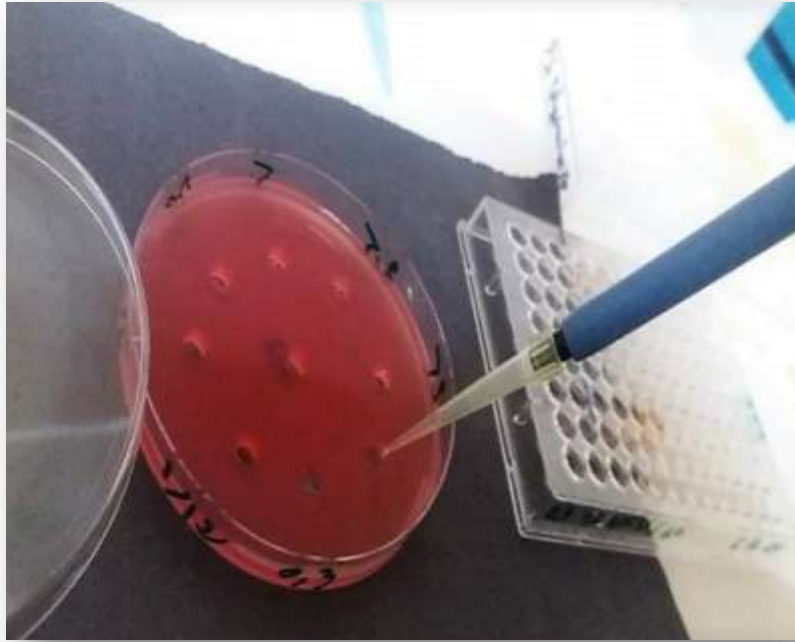


Photo 7:Le dépôt du mélange préincubé dans les puits de boîte d'AP100

Les boîtes d'agarose-poulet érythrocytaire (d'AP100) ont été ensuite incubées dans une chambre humide à la température ambiante pendant 24 heures afin de permettre une diffusion radiale des composants du sérum, et donc obtenir le maximum de lyse possible.



Photo 8:L'incubation des boîtes d'AP100 préparées dans les chambres humides.

Chapire 2 : Materiel et méthodes

Les zones de lyse obtenues après l'incubation sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse électronique en effectuant (3) mesures de diamètre des zones de lyse radiale en mm (M1 verticale, M2 horizontale, M3 inclinée) et d'après ces dernières et en exploitant l'outil de l'Excel, on obtient par conversion les autres paramètres: (la moyenne $M = (M1+M2+M3) / 3$), le rayon r ($r = M / 2$) la surface de la lyse ($S = r^2 \times \pi$), le pourcentage de la lyse (la surface de lyse de chaque mélange $\times 100 /$ la surface de lyse du PHN) permettant de calculer les taux d'inhibition respectifs ($\% \text{ de l'inhibition} = 100\% - \% \text{ de lyse}$) de la voie alterne de complément pour chaque fraction polysaccharidique testée.



Photo 9: Mesure des zones radiales d'hémolyse obtenues après le temps d'incubation.

Dans l'objectif de confirmer que les (4) fractions polysaccharidiques étudiées inhibent le complément d'une manière dose dépendante comme le cas de plusieurs études antérieures et afin d'avoir une idée sur les limites de la plage des concentrations correspondantes aux taux d'inhibition optimales expérimentalement (dans quel intervalle est valide et quand elle devient valide d'une manière inverse ou réversible), on a décidé d'augmenter le nombre et les concentrations des dilutions utilisées pour chaque solution polysaccharidique (PSR, PS1, PS2, PSG), à partir de chaque solution initiale correspondante (12,5; 10; 10; 25mg/ml respectivement) en commençant par la préparation dans chaque cas d'une solution de concentration de 10mg/ml

Chapire 2 : Materiel et méthodes

(10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125mg/ml en tube correspondant aux concentrations réactionnelles suivantes: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156mg/ml), et on prépare de la même manière précédente ces dilutions pour chaque fraction. L'incubation cette fois-ci est effectuée dans des boites d'agarose -poulet érythrocytaire à (9) puits, où 6 puits réservant le mélange de chaque solution polysaccharidique (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 mg/ml) avec le PHN dilué à 1:6 et les 3 restants sont réservés par les trois dilutions du PHN (gamme d'étalonnage de PHN: 1:6, 1:12, 1:24).



Photo 10:La préparation de dilutions des solutions polysaccharidiques et du PHN.

Les volumes nécessaires pris des différentes solutions mères polysaccharidiques (SM) et de tampon PBS/ EGTA / Mg⁺⁺ en (µl) pour la préparation des dilutions sont cités dans les tableaux suivants. Les concentrations citées sont en tube et correspond à (5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156).

Tableau7: la préparation des 6 dilutions de la fraction PSG .

Concentration	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Volume de SM	400	200	100	50	25	12,5
Volume de tampon	600	800	900	950	975	987,5

Tableau 8:la préparation des 6 dillutions de la fraction PS1.

Concentration	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Volume de SM	1000	500	250	125	62,5	31,25
Volume de tampon	0	500	750	875	937,5	968,75

Tableau9:la préparation des 6 dillutions de la fraction PS2.

Concentration	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Volume de SM	1000	500	250	125	62,5	31,25
Volume de tampon	0	500	750	875	937,5	968,75

Tableau10:la préparation des 6 dillutions de la fraction PSR.

Concentration	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Volume de SM	800	400	200	100	50	25
Volume de tampon	200	600	800	900	950	975

L'étude de l'activité inhibitrice de la voie alterne du complément de ces nouvelles (6) solutions polysaccharidiques préparées avec ces (6) dilutions en exploitant toujours la technique hémolytique fonctionnelle AP100 est ensuite effectuée de la même manière décrite précédemment et en suivant les mêmes étapes de manipulation. Les taux d'inhibition de chaque fraction polysaccharidique sont estimés

CHAPITRE 3:
RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Etude de l'activité anti complémentaire des (4) fractions polysaccharidiques

L'exploitation de la technique hémolytique fonctionnelle AP100 pour l'étude de l'activité anti complémentaire des (4) fractions polysaccharidiques nous a permis d'obtenir les résultats suivants. Les valeurs des différents paramètres calculés sont récapitulées dans le tableau ci-dessous. Les courbes ont la même allure et montrent que le taux d'inhibition augmente avec l'augmentation des concentrations réactionnelles: 0,125; 0,25; 0,5mg/ml qui correspondent aux concentrations en tube suivantes : 0,25; 0,5; 1mg/ml et cette constatation est pour les 4 courbes.

3.1.1. La fraction PS1:

Tableau11: les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les trois dilutions de la fraction PS1.

Doses(mg/ml)	M1	M2	M3	M	R	Surface	%de la lyse	% d'inhibition
PS1 1	9,28	10,08	9,55	9,64	4,82	72,94	73,99	26,01
PS1 0,5	10,51	9,87	9,84	10,07	5,04	79,69	80,84	19,16
PS1 0,25	10,41	9,82	10,4	10,21	5,11	81,87	83,05	16,95
PHN 1/6	11,54	10,95	11,12	11,20	5,60	98,58	100	0

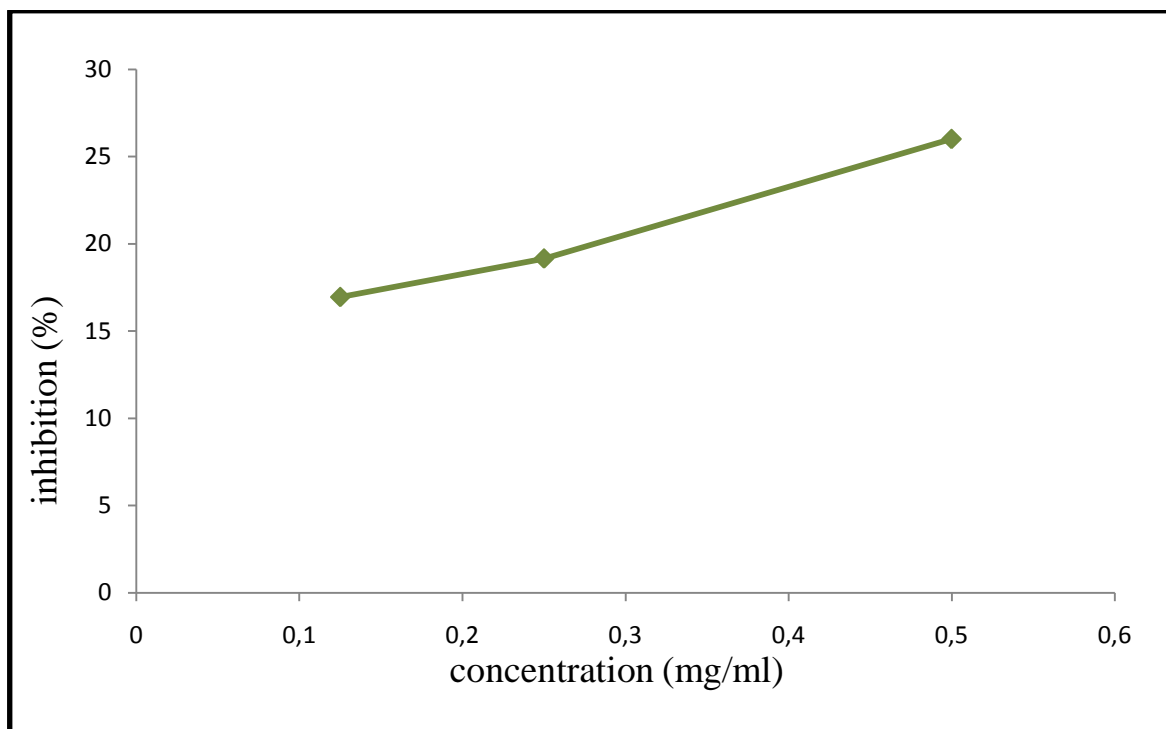


Figure 22 : courbe représentant le taux d'inhibition des trois dilutions de la fraction PS1.

3.1.2. La fraction PSR

Tableau 12: les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les trois dilutions de la fraction PSR.

La dose(mg/ml)	M1	M2	M3	M	r	surface	%de la lyse	% d'inhibition
PSR 1	9,07	9,21	9,28	9,19	4,59	66,28	67,24	32,76
PSR 0,5	9,76	9,01	9,09	9,29	4,64	67,73	68,71	31,29
PSR 0,25	9,2	9,57	10,03	9,6	4,8	72,38	73,43	26,57
PHN 1/6	11,54	10,95	11,12	11,20	5,60	98,58	100	0

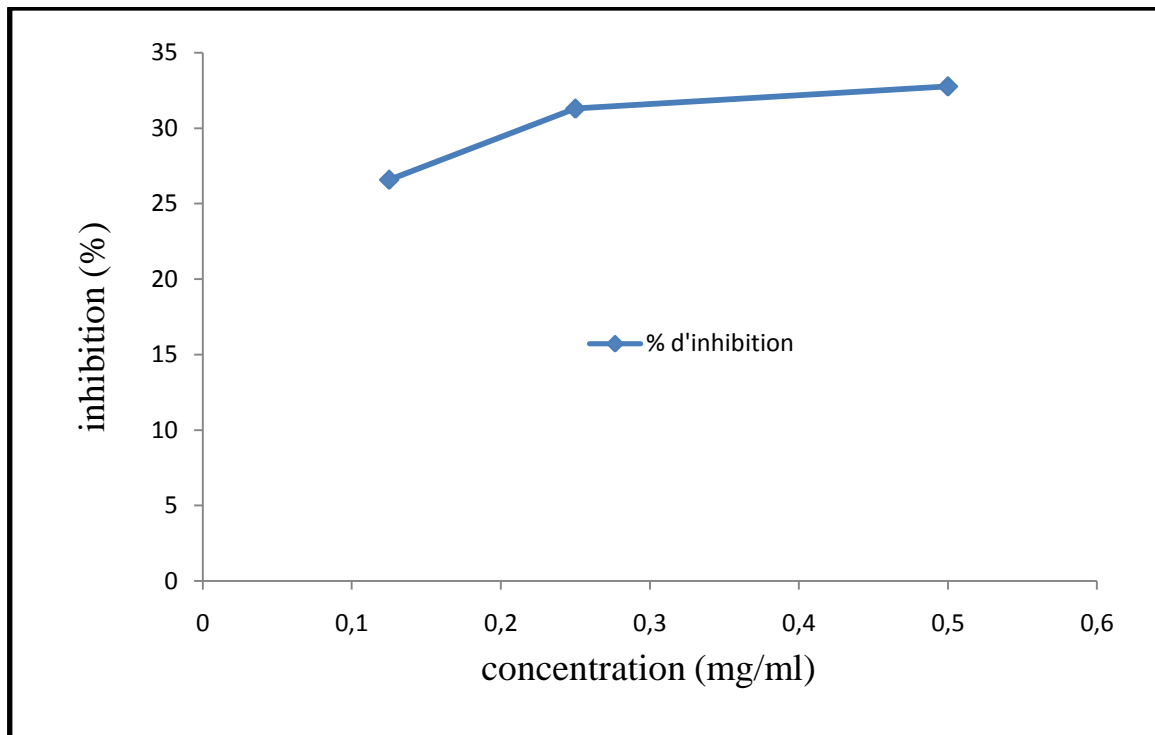


Figure 23: courbe de taux d'inhibition des trois dilutions de la fraction PSR

3.1.3. La fraction PSG

Tableau13:les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les trois dilutions de la fraction PSG.

La dose (mg/ml)	M1	M2	M3	M	r	surface	%de la lyse	% d'inhibition
PSG 1	11,26	11,03	11,21	11,167	5,58	97,93	82,20	17,80
PSG 0,5	11,33	10,69	10,5	10,84	5,42	92,29	77,46	22,54
PSG 0,25	11,36	9,97	10,21	10,51	5,26	86,81	72,86	27,14
PHN 1/6	12,32	12,26	12,37	12,32	6,16	119,15	100	0

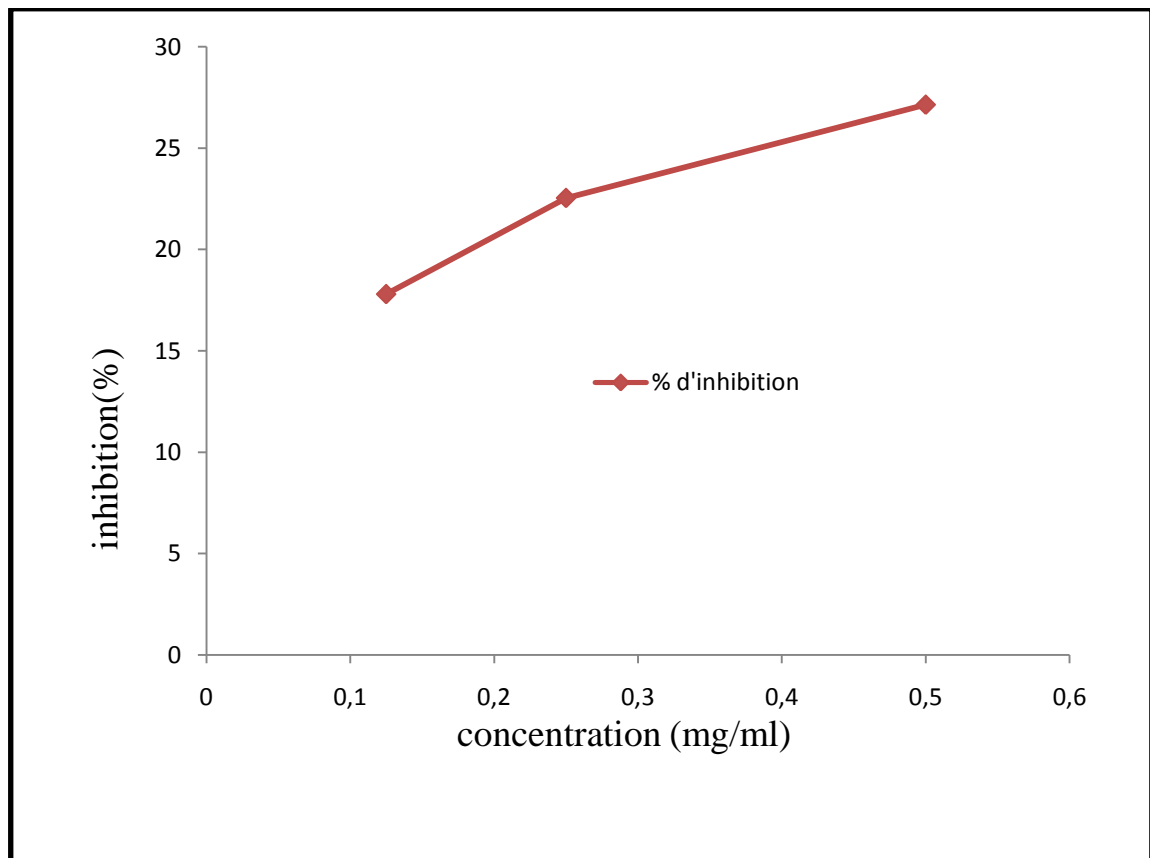


Figure 24: courbe de taux d'inhibition des trois dilutions de la fraction PSG.

3.1.4 la fraction PS2

Tableau14:les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les trois dilutions de la fraction PS2.

La dose (mg/ml)	M1	M2	M3	M	R	Surface	%de la lyse	% d'inhibition
PS2 1	11,64	10,4	11,13	11,06	5,53	96,02	80,59	19,41
PS2 0,5	10,68	10,7	10,74	10,71	5,35	90,03	75,57	24,45
PS2 0,25	10,68	10,32	10,62	10,54	5,27	87,25	73,23	26,77
PHN 1/6	12,32	12,26	12,37	12,32	6.16	119,14	100	0

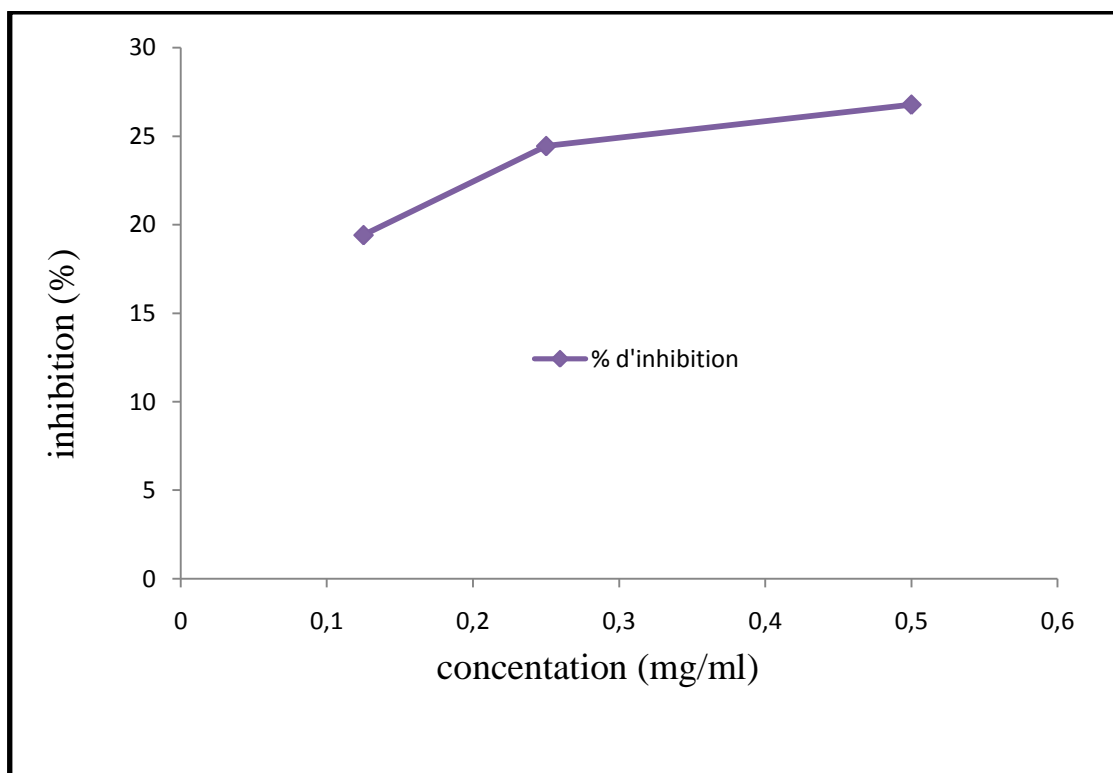


Figure 25 : courbe de taux d'inhibition des trois dilutions de la fraction PS2.

De nombreuses études ont rapporté l'activité sur complément de polysaccharides d'herbes et de plantes médicinales (Yamada et Kiyohara, 1999). Une étude précédente a montré que dix-sept polysaccharides solubles dans l'eau obtenus à partir de diverses plantes ont été testés pour des activités anti-complémentaires, une activité considérable a été observée pour la plupart de ces polysaccharides. (Yamada *et al.*, 1985). Cette étude a mis en valeur la capacité des certains

Chapitre 3 : résultats et discussion

polysaccharides issus des plantes à interagir avec les composants du système du complément et à différents stades de son activation pour l'inhiber.

Par l'utilisation de la technique hémolytique AP100 et en comparant les taux d'inhibition obtenus après l'exploitation de l'outil d'Excel pour les (4) fractions polysaccharidiques étudiées (**PS1**, **PS2**, **PSR** et **PSG**) avec le taux d'inhibition de contrôle positif représenté par l'héparine (une inhibition de 88,72% correspondant à la dose de 0.045mg/ml et également la comparaison des zones d'hémolyse obtenues avec celle du PHN, on a trouvé cette capacité d'inhibition plus précisément de la voie alterne de complément présente chez les (4) fractions, dont la plus forte est celle de la fraction **PSR**. Nos résultats sont en accord avec les études réalisées sur des extraits de différentes espèces d'*Astragalus* ont montré une large variété d'activités biologiques permettant de les qualifier d'agents antioxydant, diurétique, antidiabétique, hépatoprotecteur, neuroprotecteur, analgésique, expectorant protecteur du tractus gastro-intestinal et plus intéressant encore des effets immunomodulateurs forts à la fois *in vitro* et *in vivo*. Certains extraits d'*Astragalus* ont également été identifiés comme des antimicrobiens, antihypertenseurs et anti-inflammatoires. Un groupe diversifié de composés pharmacologiques actifs a été isolé des racines, des feuilles, des gousses et des graines d'*Astragalus* (Chouana, 2017). Les deux fractions: **PS1** et **PS2** issues d'*Astragalus gombo* sont des polysaccharides de nature pectique.

La relation entre la structure et l'activité biologique des polysaccharides pectiques est proposée pour la première fois par Yamada *et al.* (1986), après l'étude des polysaccharides pectique issus de *Bupleurum falcatum L*, une plante japonaise utilisée en médecine traditionnelle pour les hépatites chroniques et les maladies auto-immunes (Angone *et al.*, 2010).

Vue à leur activité anti complément importante prouvée, ils sont même utilisés parfois comme un contrôle positif pour l'étude de l'inhibition de système de complément par d'autres polysaccharides. Samuelsen *et al.* (1999) ont utilisé une fraction pectique appelée PMII comme contrôle positif dans le cadre de l'étude d'activité anti complément des fractions d'hétéroxylane issues de la plante médicinale *Plantago major L*.

Chouana, (2017) par une analyse Chromatographique en Phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse, a déterminé la composition en monosaccharides constitutifs (% molaire) des (2) fractions polysaccharidiques extraites des tiges (**PS1** et **PS2**).

Le pourcentage molaire (%) de composition de la fraction **PS1** en monosaccharides **Gal**, **Ara**, **Rha**, **Glc**, **Xyl**, **GalA** et **GlcA** est respectivement: **13,4/ 21,5 /9,7/4,1/ 31,7/ 13,5/ 5,9** (Chouana, 2017).

Chapitre 3 : résultats et discussion

L'analyse de la composition en monosaccharides de la fraction **PS1** (voir le tableau 15) ., a montré une composition différente comparée à celle de **PS2**. Notons la richesse en xylose (31,8 %), en arabinose (21,6 %) et en galactose (16,9 %). Cette composition en monosaccharides est proche de celle des hémicelluloses (Chouana, 2017). Les hémicelluloses sont l'un des trois composants principaux de la biomasse lignocellulosique, représentant environ 20-40 % de la biomasse en poids (Wertz, 2011). Les hémicelluloses contiennent plusieurs sucres à 5 atomes de carbone (sucres C5) tels que le xylose et l'arabinose, des sucres à C6 tels que le glucose, le mannose, le galactose, l'acide galacturonique et l'acide glucuronique. Les résidus de xylose ont également été jugés pour leur effet sur l'activité anti complémenteaire.

Samuelsen *et al.* (1999) ont prouvé la forte activité anti complémenteaire de l'extrait polysaccharidique brut isolé et des fractions obtenues après fractionnement de ceu-ci à partir des graines de *Plantago major L.*, qui sont des hétéroxylanes. La concentration de ces polysaccharides à inhiber la lyse des érythrocytes à 90% a été estimée est 750 µg / ml, qui est une activité inhibitrice très prometteuse. La fraction obtenue après fractionnement de l'extrait brut est composée de : 37,5 % de xylose, 27,6 % d'arabinose, 17,3 % d'acide galacturonique, 5,2 % d'acide glucuronique, traces de rhamnose, 6,8 % de galactose et 4,0 deglucose (Samuelsen *et al* 1999). Cette fraction consiste en un squelette de β -D-Xylp lié en (1-4) avec de courtes chaînes latérales attachées en position 2 dans certains résidus de β -D-Xylp liés en (1-4). Les chaînes latérales sont constituées de β -D-Xylp, de α -L-Araf et de α -D-GlcpA. Des résidus α -D-GalpA liés en (1-4) ont également été détectés, en plus de petites quantités de Rhap et de Galp (Samuelsen *et al* 1999). La fraction polysaccharidique **PS1** possède une teneur importante en xylose (31.7 %) et qui est très proche de celle de la fraction étudiée par Samuelsen *et al.* (1999), possédant 37.5 % de xylose.

De nombreux polysaccharides possédant dans leur composition osidique des résidus galactose et arabinose, ont été un sujet dont ils ont prouvé leur effet intéressant sur l'activité anti complémenteaire de ces polysaccharides actifs.

Les polysaccharides, tels que les arabinogalactanes, les galactanes et les glucanes, possèdent une activité immunomodulatrice, interagissent directement ou indirectement avec le système immunitaire (Jia *et al.*, 2018). Les teneurs élevées en arabinose et en galactose ainsi que l'existence de structures ramifiées sont des exigences pour l'activité anticomplémenteaire. (Du *et al.*, 2016).

Wang *et al.* (2016) ont également suggéré dans leur étude que les activités anti-complémenteaires des deux polysaccharides étudiés par eux même, sont probablement dues à la présence de galatose et d'arabinose dans leurs structures chimiques. Plusieurs polysaccharides de

Chapitre 3 : résultats et discussion

plantes sont biologiquement actifs et ont des effets sur le système immunitaire humain. Des exemples en sont les arabinogalactanes des baies de *Viscum album* étudiés par Wagner et Jordan. (1988), et ceux de *Echinacea purpurea* testés par Wagner *et al.* (1988) et les pectines d'*Angelica acutilobu* par Kiyohara *et al.* (1988) (Samuelsen *et al.*, 1998).

Un exemple d'étude, les travaux réalisés par Samuelsen *et al.* (1998), où ils ont prouvé qu'un arabinogalactane (PMIa) extrait des feuilles de *Plantago major* avec un poids moléculaire de 77 à 80 kDa, possède une activité anti-complément puissante. Ce polysaccharide se compose d'arabinose (38%), de galactose (49%), de rhamnose (6 %), l'acide galacturonique (7%) (Samuelsen *et al.*, 1998).

La composition de la fraction **PS2** en monosaccharides **Gal, Ara, Rha, Glc, Xyl, GalA** et **GlcA** est respectivement: **16,8/ 8,9/ 11,9/ 4,7/ 3,9/ 52,1/ 1,4** comme mentionné dans le tableau 15. Les polysaccharides riches en acides galacturoniques sont désignés sous le nom de polysaccharides pectiques acides. (Chouana, 2017). Tant que ce polysaccharide est riche en acides galacturoniques (52,1%), par conséquent il est de nature pectique acide. La composition de **PS2** est proche de celle des rhamnogalactane de type I (RG-I) (Chouana, 2017).

Plusieurs travaux montrent que les pectines acides comme les homogalacturonanes (HG), rhamnogalactanes (RG) isolés des plantes utilisées en médecine traditionnelle comme le RG-I extrait à partir de *Bupleurum falcatum*, présentent des activités biologiques sur les macrophages, lymphocytes-T, activité anti-ulcère, la régulation de l'activité des récepteurs FC des macrophages, sur les cellules natural killer (NK), et également sur le système du complément (Angone *et al.*, 2010). Les auteurs montrent que le motif actif caractérisé des RG-I de *Bupleurum falcatum* qui aurait des effets importants sur le système du complément serait plus probablement des complexes d'oligomères de galactanes composés des chaînes distinctes de (1-3) et (1-6) galactose, avec l'existence des branches. Plusieurs travaux montrent aussi que l'activité biologique des pectines sur le système immunitaire serait essentiellement liée aux chaînes latérales des RG-I (Angone *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que certains polysaccharides qui possèdent une activité anti complément considérable, contiennent couramment les résidus α -D-GalpA et α -L-Rhap dans la chaîne principale. La présence d'un squelette formé d'unité récurrente dans le polysaccharide pourrait être très importante dans l'activité anticomplément (Wang *et al.*, 2016).

Selon d'autres études réalisées par Zhao *et al.* (1991), Hiroako *et al.* (1996) et Di *et al.* (2013), les glycanes contenant de l'acide galacturonique ont été jugés importants pour l'activité anti complémentaire des polysaccharides (Du *et al.*, 2016).

Chapitre 3 : résultats et discussion

Du *et al.* (2016) ont arrivé à trouver une relation entre l'activité anti complément des polysaccharides étudiés et leur teneurs en acide uronique notamment l'acide galacturonique.

Les résultats d'analyse de composition des deux polysaccharides ramifiés étudiés, montrent la richesse de polysaccharide qui possède l'activité anti complément la plus forte (PW-PS2) en acide galacturonique (42.0%), en galactose (22.2%) et en arabinose (12.3%). Ces deux polysaccharides avaient des teneurs similaires en protéines et en sulfates (Du *et al.*, 2016).

La faible teneur relative en acide galacturonique de deuxième polysaccharide ramifié étudié (PW-PS1) peut être une explication possible de son faible activité anti complément par rapport au premier polysaccharide (Du *et al.*, 2016).

Pour valoriser et confirmer l'effet intéressant d'acide galacturonique sur l'activité anti complément, plusieurs chercheurs scientifiques travaillent sur la modification de la composition des polysaccharides natifs, plus précisément en effectuant une réduction des groupes carboxyle de GalA, ensuite ils étudient l'influence de cette modification sur l'activité anti complément de ces nouveaux polysaccharides étudiés.

De plus, l'activité anti complémentaire et les cibles de leurs produits réduits en groupes carboxyle des polysaccharides ont également été étudiées, selon la découverte précédente que les acides uroniques présents dans les polysaccharides pourraient influencer leur activité anti complémentaire (Du *et al.*, 2016). Cette étude est en accord avec celle de Kiyohara *et al.* (1988), qui a prouvé que lorsque les groupes carboxyle de GalA dans les polysaccharides pectiques acides étudiés ont été réduits, 90% de la GalA ont été convertis en Gal. Les nouveaux polysaccharides avec des groupements carboxyles réduits étant difficiles à solubiliser dans l'eau après réduction, et l'activité anti-complémentaire qui a été mesurée pour ces polysaccharides modifiés a été réduite. Par conséquent, la réduction des carboxyles des polysaccharides a considérablement diminué leurs activités anti-complémentaires. Ces résultats suggèrent que les groupes carboxyles de GalA dans les polysaccharides acides affectent leurs activités anti-complémentaires (Kiyohara *et al.*, 1988). Plus intéressant encore, l'activité anti-complément de polysaccharide testé a été largement réduite dans le produit réduit en carboxyle. Alors, ils ont suggéré que les groupes carboxyle jouent également un rôle important dans l'activité anti-complément (Wang *et al.*, 2016). Ces études antérieures et beaucoup d'autres ont réussi à apprécier le rôle crucial que jouent les groupes carboxyles d'acide galacturonique des polysaccharides sur leur activité anti complémentaire.

Tableau15: la composition en monosaccharide (%molaire) des deux fractions polysaccharidique PS1 et PS2.

Monosaccharides (% molaire)							
Fraction	Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	GalA	GlcA
PS1	13,4	21,5	9,7	4,1	31,7	13,5	5,9
PS2	16,8	8,9	11,9	4,7	3,9	52,1	1,4

Source : (Chouana, 2017)

La fraction **PSG** issue des grains *d'Astragalus gombo* est un galactomannane. Les galactomannanes qui ont un squelette de mannose sur lequel se greffent des résidus galactose ; on les trouve comme composés majeurs de stockage dans les graines de certains dicots tels que légumineuses (guar, caroube, tara...) (Wertz,2011). Cette fraction de galactomannane est exclusivement composée de deux monosaccharides neutres: le mannose et le galactose (Chouana, 2017). La caractérisation structurale (voir le tableau 16) a indiqué que cette fraction est un galactomannane avec un rapport mannose / galactose de 1.7 formé par un squelette de résidus β -(1-4)-D-mannopyranosyle ($63 \pm 0,7$ % mol), substitués en position O-6 par un seul résidu de galactopyranose ($37 \pm 0,9$ % mol), avec un poids moléculaire moyen de 1.1×10^6 g /mol (Chouana *et al.*, 2017). Les galactomannanes ont été mis en évidence pour leurs propriétés antioxydantes et immunomodulatrices. Les polysaccharides du genre *Astragalus* ont une large gamme d'effets immunomodulateurs sur les animaux, probablement en raison de leur hétérogénéité structurale, leurs compositions en monosaccharides, leurs masses moléculaires, leurs liaisons glycosidiques et leurs conformations de chaîne (Boual *et al.*, 2015).

Il a été établi que de nombreuses paramètres chimiques (poids moléculaire, rapport Man/ Gal, degré de ramifications) des Galactomannanes pouvaient être trouvées en raison de la grande hétérogénéité des espèces végétales. Par conséquent, les Galactomannanes sont considérés comme des polysaccharides végétaux multifonctionnels largement répandus dans la nature (Boual *et al.*, 2015). Les zones non substituées des chaînes de galactomannanes sont à la base des interactions intramoléculaires (la molécule se replie alors sur elle-même) et des associations intermoléculaires (la molécule s'associe alors à une autre molécule) (Dakia *et al.*, 2010).

Les chaînes de galactomannanes fortement ramifiées (avec un rapport Man/ Gal bas) interagissent préférentiellement avec l'eau, tandis que les chaînes peu ou pas ramifiées interagissent entre elles ou avec d'autres molécules par le biais des zones non-substituées.

Chapitre 3 : résultats et discussion

L'augmentation (ou la force) des interactions évolue avec la diminution du nombre d'unités galactose et la distribution en bloc des galactoses dans les galactomannanes (Dakia *et al.*, 2010). D'après la description structurale de notre galactomannane étudié avec un rapport Man/ Gal équivalent à 1.7 (37 ± 0.9 % mol du Gal). En comparant cette valeur avec d'autres valeurs de rapport Man/ Gal, il semble qu'il est moyennement ramifié ce qui explique probablement son activité anti complémentaire prouvée, évidemment après son interaction intermoléculaire avec ses éléments cibles probables de la voie alterne de système du complément. En outre, l'activité anti complémentaire de la fraction **PSG** est probablement liée à l'existence des résidus D-galactose, et comme on a décrit précédemment, les polysaccharides testés pour cette activité renfermant ce résidu, ont fortement prouvé et à de nombreuses occasions d'études antérieures, qu'ils sont capables d'être exploités comme substances inhibitrices de complément pour des fins thérapeutiques, citons les travaux de: Jia *et al.* (2018) ; Du *et al.* (2016); Wang *et al.* (2016); Boual *et al.* (2015); Samuelsen *et al.* (1999) et Samuelsen *et al.* (1998) et qu'on a discuté déjà.

Tableau16: la composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique (PSG) des graines d'*Astragalus gombo* .

Monosaccharides(mol%)			
Extrait	Gal	Man	Manp/Galp
PSG	37±0,9	63±0,7	1,7

Source : (Chouana, 2017)

La fraction **PSR** est un polysaccharide extrait à partir des racines de la plante d'*Astragalus gombo*. En pharmacopie chinoise les polysaccharides issus des plante du genre *Astragalus* ont une variété d'activité biologique citant immunomodulatrice, antitumorale et hypoglycémiant (Zhu *et al.*, 2011).

En médecine chinoise, les racines d'Astragales sont utilisées en décoction ou elles sont mises à mijoter dans les ragoûts de riz qui sont alors recommandés pour dynamiser l'énergie vitale et renforcer la résistance du corps. Ainsi, du fait de ses propriétés toniques et immunostimulantes pour le traitement du diabète et des néphrites, la racine séchée d'Astragale est utilisée avec d'autres produits d'herboristerie pour traiter la baisse de l'immunité cellulaire qui suit des traitements thérapeutiques lourds tels que la chimiothérapie. Elles sont également utilisées pour la régénération des tissus, la cicatrisation des plaies et la fabrication de médicaments visant à renforcer le système immunitaire après les traitements anticancéreux (Chouana, 2017). Les hétéropolysaccharides extraits à partir des racines d'Astragales sont

Chapitre 3 : résultats et discussion

généralement des glucanes (**PSR** est un glucane) avec des substitutions formant les branches de la chaîne principale à savoir par des résidus de: l'acide glucuronique (GlcA), de l'acide galacturonique (GalA), de glucose (Glc), de galactose (Gal), d'arabinose (Ara), de rhamnose (Rha), de mannose (Man), de xylose (Xyl), de fucose (Fuc), fructose (Fru) et de ribose (Rib) (Chouana, 2017). la majorité de ces résidus constitutifs affectent l'activité anti complémentaire des polysaccharides prouvant l'existence d'une relation entre l'activité anti complémentaire des fractions testées et leurs compositions osidiques.

Zhu *et al.* (2011) ont mentionné qu'un polysaccharide astragale de type α -(1-4)-D-glucane branché possède une importante activité immunomodulatrice. Ils sont également signalé qu'un autre α -(1-4)-D-glucane a un potentiel effet thérapeutique sur la gloméronephrite. deux fractions polysaccharidiques API et APII ont été extraites à partir des racines d'*Astragalus mongholicus* possédant une épine dorsale formée de (1-3)- β -D glucopyranosyl ont prouvé une activité antitumorale importante après leur exploitation dans une expérimentation animale (injection des polysaccharides dans des souris).

3.2 La nature d'inhibition de l'activation de la voie alterne du complément par les (4) fractions polysaccharidiques étudiées

Après notre deuxième essai consistant à élargir la gamme des dilutions des (4) solutions polysaccharidiques testées et d'après l'analyse les courbes de taux d'inhibition obtenues des 4 fractions en fonction de ses différentes concentrations utilisées, on constate qu'ils ont pratiquement la même allure. Les résultats sont montrés dans les courbes suivantes.

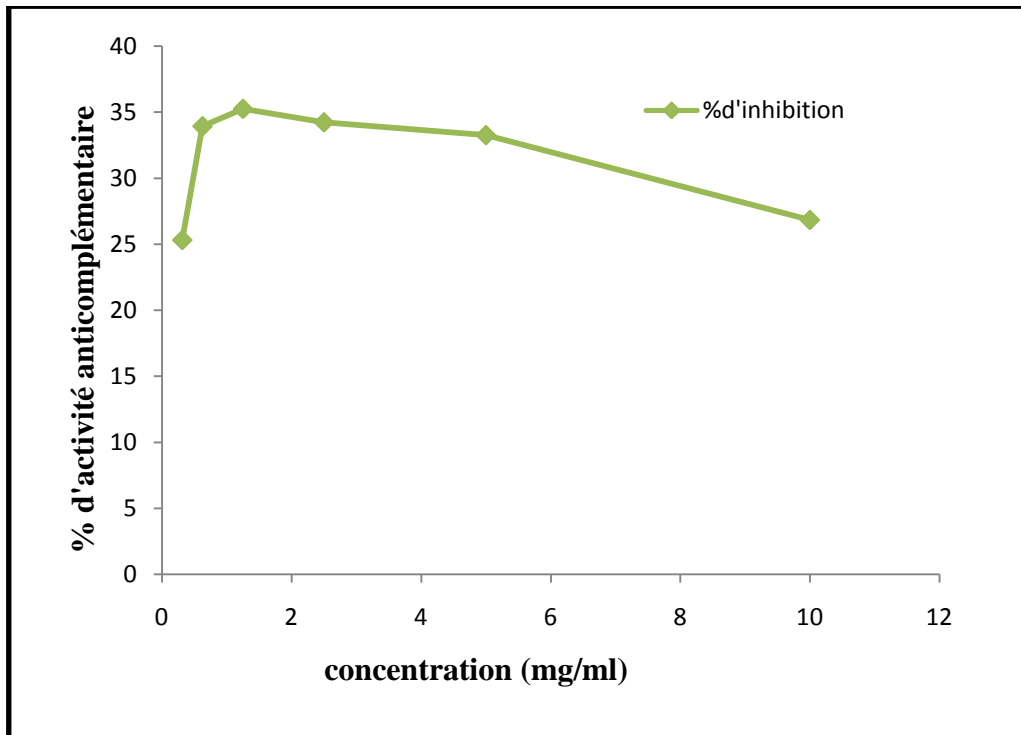


Figure26: courbe de taux d'activité anticomplémentaire des six dilutions de la fraction PS1.

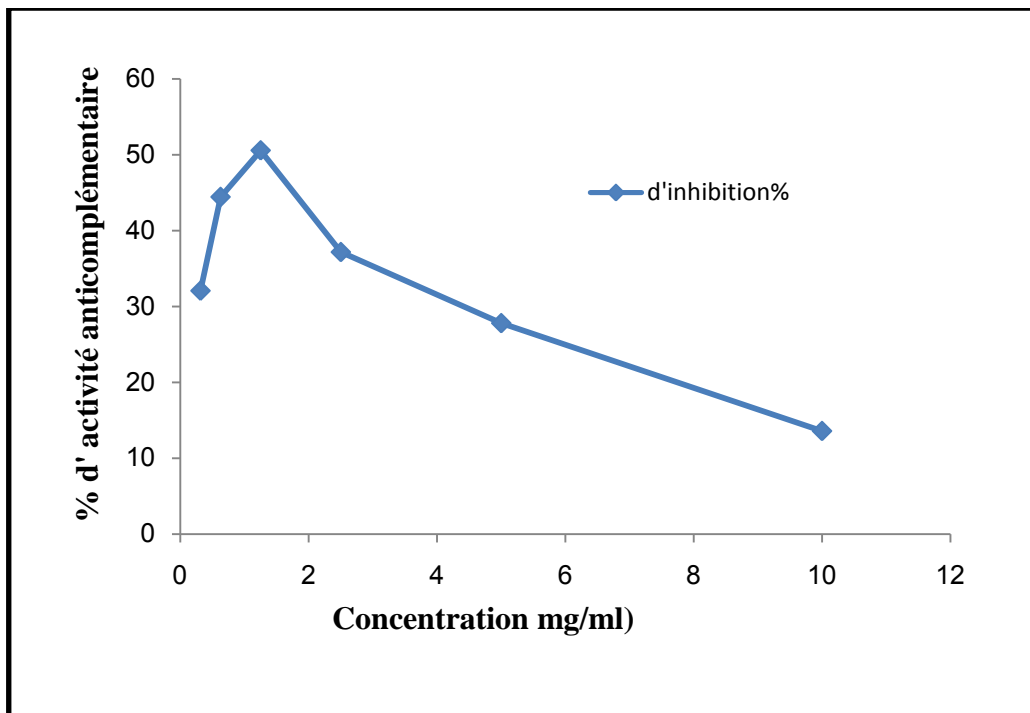


Figure 27 : courbe de taux d'activité anticomplémentaire des six dilutions de la fraction PSR.

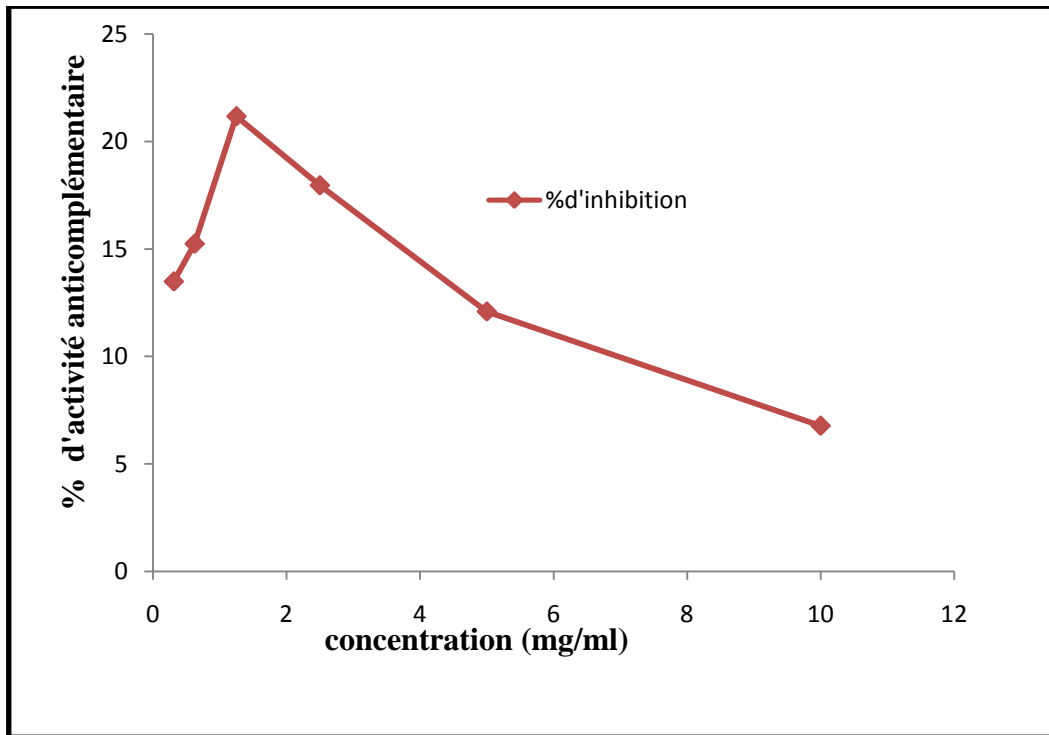


Figure28: courbe de taux d'activité anticomplémentaire des six dilutions de la fraction PSG.

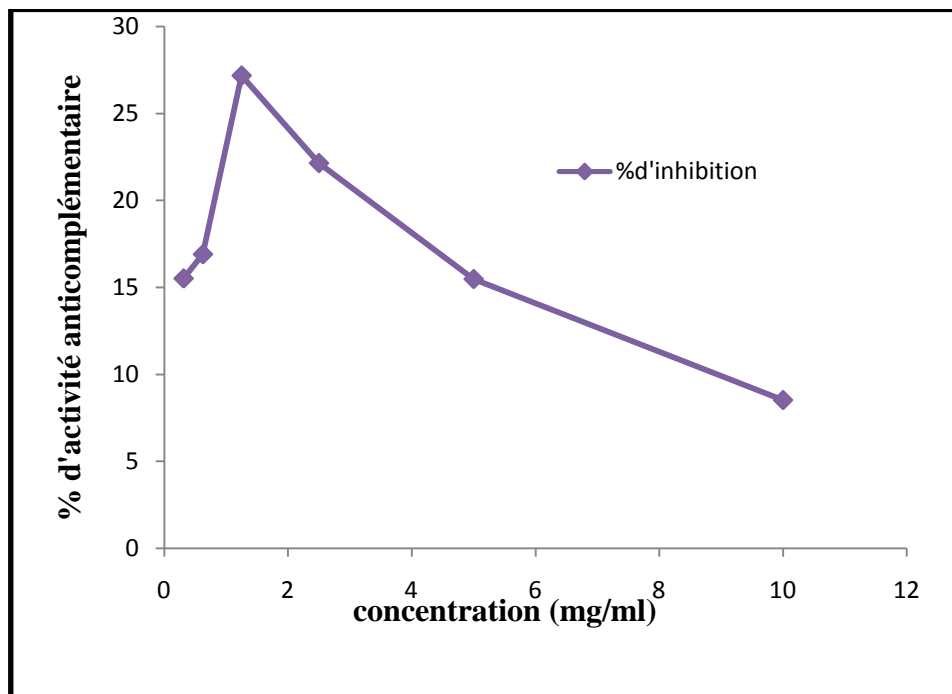


Figure 28 : courbe de taux d'activité anticomplémentaire des six dilutions de la fraction PS2.

L'étude de l'activité anti-complémentaire des (4) fractions polysaccharidiques issues d'*Astragalus gombo*: PS1, PS2, PSR, PSG et le contrôle positif l'héparine par la technique hémolytique

Chapitre 3 : résultats et discussion

AP100, a montré qu'elles ont toutes bloqué l'hémolyse des érythrocytes de poulet par la voie alternative de complément de manière dose-dépendante cela signifie que l'activité inhibitrice de polysaccharide est dépendante de son dose utilisée (concentration). Autrement, le taux d'inhibition de l'activation du système du complément par le biais de la voie alternative de chaque fraction polysaccharidique seule, augmente avec l'augmentation de sa concentration.

Les résultats obtenus sont en accord avec une multitude des études antérieures sur les polysaccharides citant comme exemple celle réalisée par Wang *et al.* (2008), qui ont étudié l'activité anti complément des 4 fractions polysaccharidiques extraites et purifiées à partir de son de riz dégraissé et ont prouvé qu'elles ont toutes inhibé l'activation de complément d'une manière dose dépendante. Le même résultat a été atteint par Wang *et al.* (2016), après une étude de l'activité anti complément d'un polysaccharide acide issu de *Forsythia suspensa*. C'est le cas également de l'étude réalisée par Wang *et al.* (2017), où il a été signalé que les deux polysaccharides issus à partir de *Eclipta prostrata* étudiés, provoquent l'inhibition de l'hémolyse des érythrocytes de mouton par la voie alterne de complément à 50% d'une manière dose-dépendante et même par Samuelsen *et al.* (1998) qu'ils ont testé des fractions d'arabinogalactane issues des feuilles de *Plantago major L.*, et ils ont signalé que l'activité augmente avec l'augmentation des concentrations en polysaccharides.

Dans un premier temps et dans la plage des doses située entre 0,125 et 0,625 mg/ml, il ya une interaction intermoléculaire entre les molécules polysaccharidiques et des sites limités des composants de la voie alterne du complément similaire à une interaction enzyme-substrat tant que les éléments de complément sont des enzymes. Cette interaction induit à un blocage de l'hémolyse des érythrocytes de poulet, c'est le phénomène d'inhibition. Dans ce cas la notion de la dose-dépendance de l'activité anti complémentaire de toutes les fractions polysaccharidiques en question, est validée.

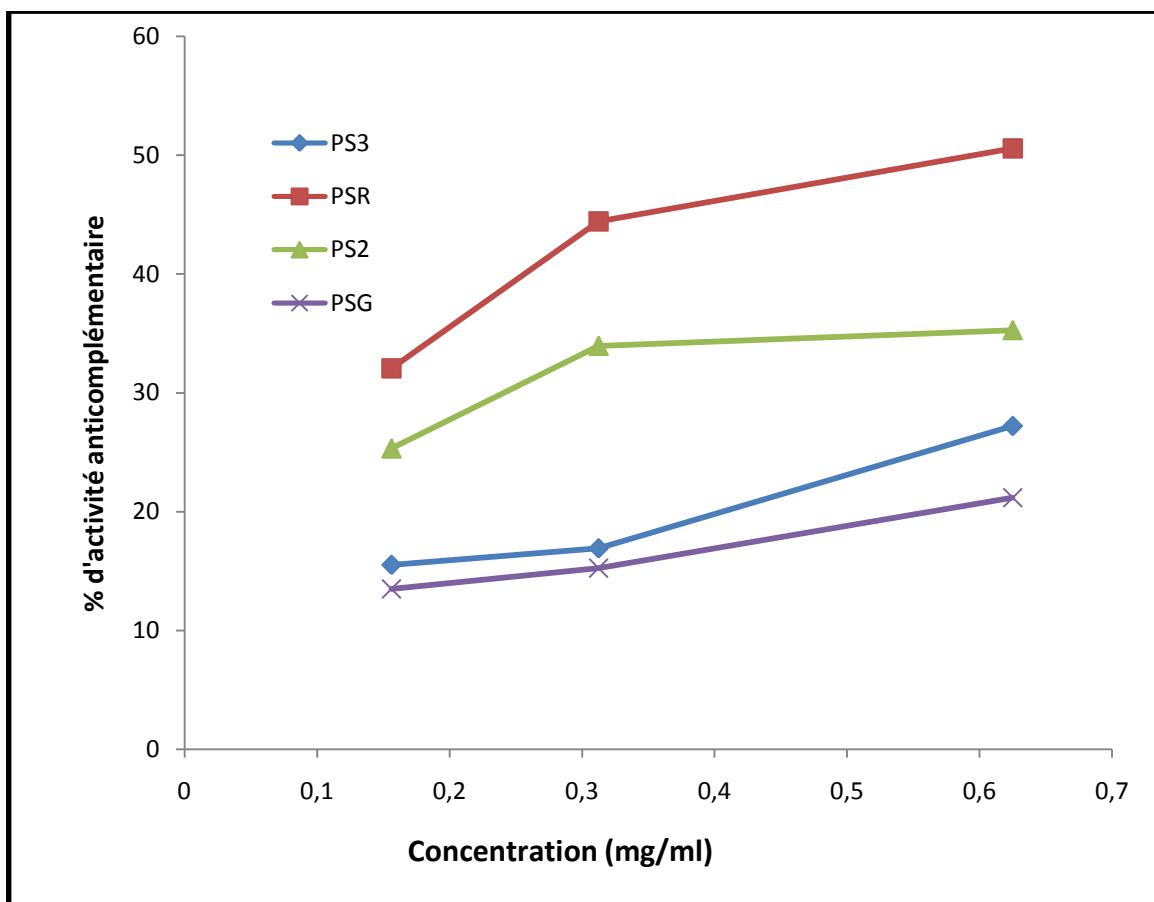


Figure 29:représentation graphique du phénomène d'inhibition.

Le résultat atteint est effectivement compatible avec des études antérieures sur l'activité anti complémente déjà réalisées où les concentrations (doses) inhibitrices (CI) pour la majorité des cas sont comprises dans cette plage des doses : $0.2 \text{ mg/ml} \leq \text{CI} \leq 1 \text{ mg/ml}$. Parmi ces études on mentionne les résultats des travaux suivants :

- Selon Wang *et al.* (2008), la CI de l'hétéro polysaccharide RBP2a qui provoque l'inhibition de complément à 90% est **1000 $\mu\text{g/ml}$** .
- Selon Wang *et al.* (2016), la CI de polysaccharide natif(Fs-8-ba2)qui provoque l'inhibition par la voie alterne du complément à 50% est **0.218 \pm 0.015 mg/m**.
- Selon Wang *et al.* (2017), l'inhibition de l'hémolyse par les deux polysaccharides:EAP1 et EAP2 est **0.198 \pm 0.043 et 0.273 \pm 0.038mg/ml** respectivement.
- Selon Angone *et al.* (2010), Les tests biologiques de l'extrait brut contenant différents hétéroxylanes présentent une grande activité anti complémente (90 % d'inhibition) à une concentration de **750 $\mu\text{g/ml}$** .
- Selon Boual *et al.* (2015),ladose de l'inhibition de l'hémolyse par legalactomannane WSPF testé est de **1000 $\mu\text{g/ml}$** .

Chapitre 3 : résultats et discussion

Tout en allant vers les concentrations supérieures à 0,625mg/ml, il ya une réversibilité du premier phénomène expliquée par l'apparition d'une compétition entre les molécules polysaccharidiques sur les sites limités des composants de la voie alterne du complément, par conséquent les enzyme sont libres, elles se réactivent normalement par cascade protéolytique induisant la formation du complexe d'attaque membranaire CAM et donc le déblocage de l'inhibition et l'hémolyse des érythrocytes. Cette fois-ci l'activité inhibitrice des polysaccharides testés se réduit significativement avec l'augmentation de l'échelle de concentrations où l'inhibition devient dose dépendante d'une manière inverse, tout en constatant que la dose qui correspond à la l'activité inhibitrice maximale est celui de 0,625mg/ml pour toutes les 4 fractions étudiées, ce qui nous a permet de dire que ces fractions peuvent probablement avoir un caractère biphasique comme dans le cas de l'héparine (deviennent activatrice d'une manière indirecte de la voie alterne de système du complément à une plage donnée de concentrations).

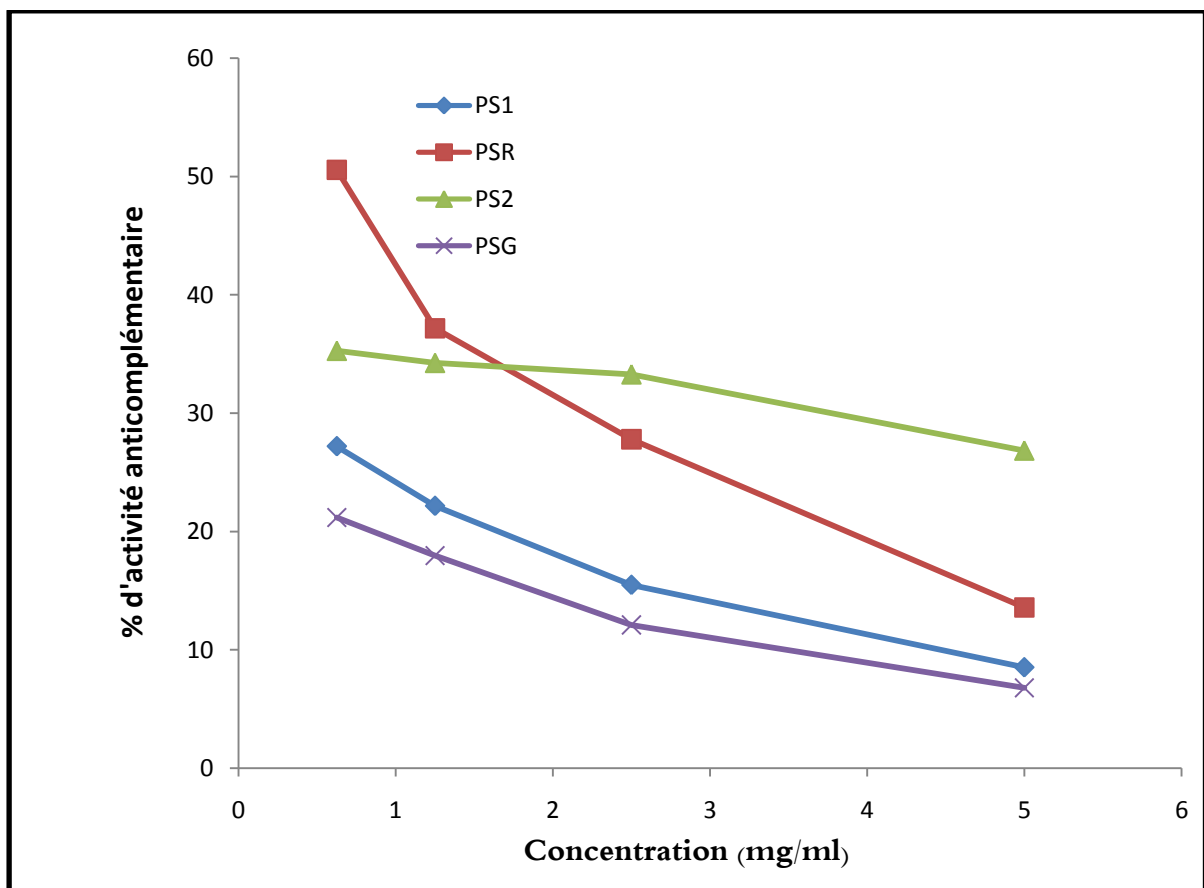


Figure 30:représentation graphique du phénomène de réversibilité de l'inhibition.

Par l'analyse attentive des résultats représentés sous forme des courbes, et en se basant sur la logique mathématique fait impliquant le calcul des concentrations à partir des équations des graphes des taux d'inhibition en fonction des doses des fractions polysaccharidiques dans le cas de phénomène de réversibilité, on peut avoir une probable prédiction sur les valeurs des

Chapitre 3 : résultats et discussion

concentrations responsables de la disparition de premier phénomène (l'inhibition) et l'apparition de deuxième (réversibilité) dans toutes les fractions théoriquement. Les résultats des calculs sont récapitulés dans le tableau suivant.

Tableau17: les valeurs des concentrations responsables de changement de phénomène de l'inhibition.

Fraction	A	b	C
PSR	-7,76	50,46	6,50
PS1	-1,92	36,907	19,22
PS2	-4,09	27,92	6,83
PSG	-3,22	22,041	6,85

Tenu compte que C c'est la valeur de concentration, $C=(-b/a)$

Par l'utilisation du test de la régression linéaire par estimation de courbe traité par le programme de SPSS, on a trouvé que ces deux phénomènes (l'inhibition et son réversibilité) sont reliés à 92,4 % ($R^2=0,924$ avec un $P= 0,009$) entre eux et l'apparition de deuxième implique obligatoirement la disparition de premier, ça signifie que les molécules (les molécules polysaccharidiques et les composants de complément contenant dans le PHN) mises en jeu dans les deux phénomènes de blocage et de déblocage de la voie alterne sont les mêmes. Cette relation est montrée dans la courbe suivante où le degré d'inhibition est représenté par la variable indépendante à positif, tandis que le degré de sa réversibilité est représenté par la variable dépendante à négatif.

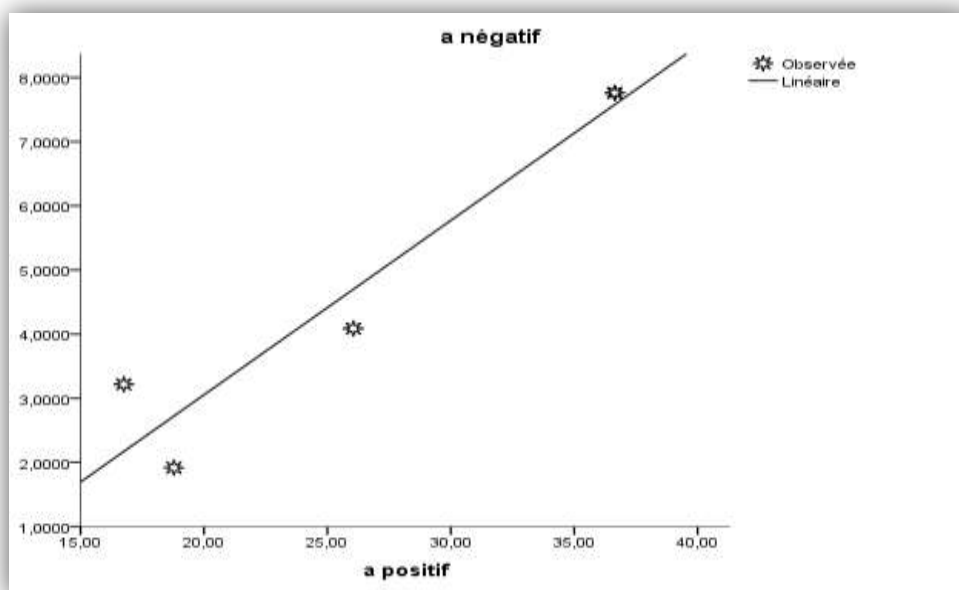


Figure 31: la courbe de test de la régression linéaire obtenue par SPSS.

3.3. Comparaison entre le pouvoir inhibiteur des 4 fractions Polysaccharidiques

Vue aux résultats obtenus par la technique hémolytique fonctionnelle AP100, la fraction ayant la plus forte activité anti complémentaire est la fraction **PSR** extraite à partir des racines puis la fraction **PS1** $35,26 \% \pm 0,0543$, puis **PS2** $27,19 \% \pm 0,0513$ et finalement la fraction **PSG** $21,17 \% \pm 0,0124$ % en dernière (voir la figure 30). dans les résultats de chaque essai. Cette fraction peut atteindre une valeur d'inhibition équivalente à $50,56\% \pm 0,0901$ % autrement dit cette fraction consomme pratiquement la moitié des éléments du complément contenant dans le PHN et à une dose non toxique ($0,625\text{mg/ml}$), par conséquent elle prévient l'hémolyse des érythrocytes à la moitié. Cette constatation peut rendre ce polysaccharide un inhibiteur prometteur de la voie alterne du complément.

Les résidus monosaccharidiques: GalA, Gal, Rha et Ara ont été jugés par plusieurs études antérieures pour leur effet important sur l'activité anti complément des polysaccharides testés.

Les deux fractions **PS1** et **PS2** possèdent la même composition en monosaccharides constitutifs avec des teneurs différentes, et les deux ont dans leur composition osidique des résidus de galactose, en commun avec la fraction **PSG** qui est un Galactomannane. Les fortes teneurs en GalA (52.1%), en Gal (16.8%) et en Rha (11.9%) de **PS2**, explique son activité anti complémentaire considérable par rapport à celle de **PS1** qui possède des teneurs en résidus constitutifs mentionnés respectivement: (13.5%), (13.4%), (9.7%) et qui sont relativement faibles. La composition osidique de la fraction **PSR** semble proche et plus diversifiée à celle de **PS1** et **PS2** selon Chouana. (2017) mais probablement avec des teneurs différentes. L'activité inhibitrice de la voie alterne de complément de la fraction **PSG**, réside essentiellement dans l'existence de Gal ($37 \pm 0,9\%$) dans son composition osidique, en tant qu'un galactomannane, sans l'existence de GalA qui est l'un des exigences les plus pertinentes de l'activité anti complémentaire des polysaccharides en question.

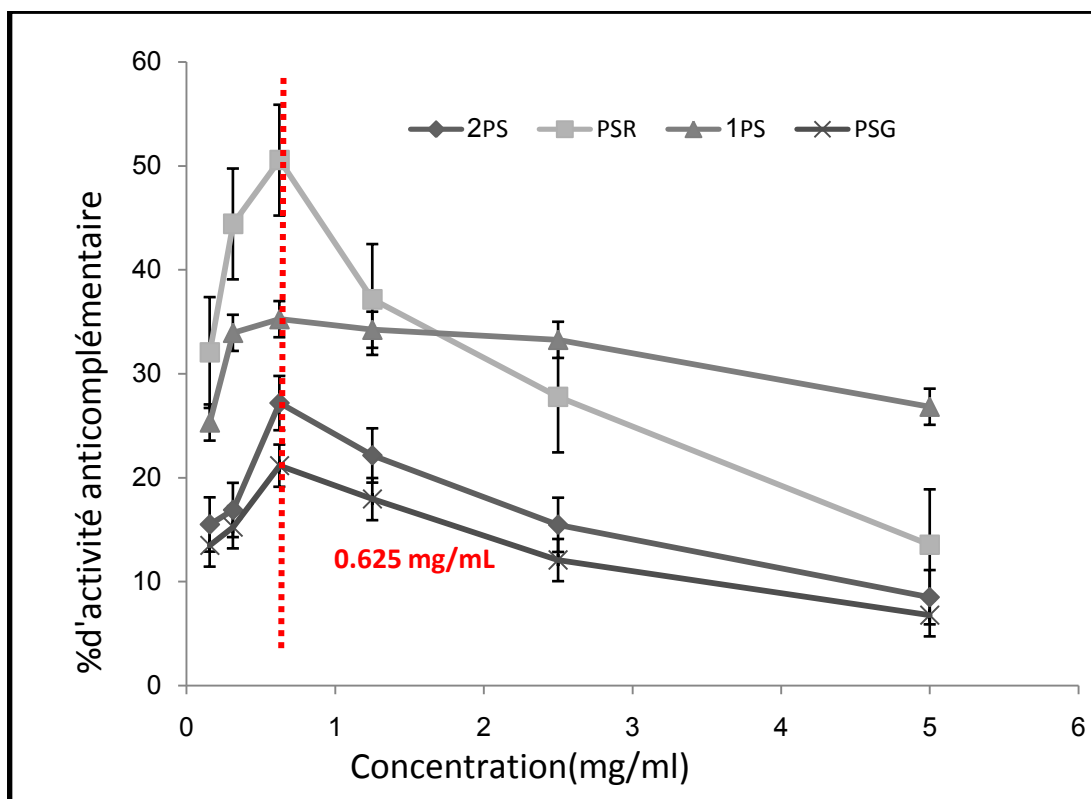


Figure32: les courbes des taux d'inhibition des six dilutions des 4 fractions polysaccharidiques (PS1, PSR, PSG, PS2).

Les activités biologiques des polysaccharides notamment l'activité anticomplémentaire est affectée par plusieurs facteurs surtout leur composition chimique en monosaccharides.

Dans l'objectif d'étudier la relation entre le polysaccharide et sa composition osidique et par l'utilisation du test de corrélation bivariée traité par le programme SPSS entre deux paramètres qui sont le taux d'inhibition maximale de la voie alterne de complément de fraction polysaccharidique testée et sa teneur en glucose, on a trouvé que la teneur en glucose explique 87,8 % la variation de taux d'inhibition du fraction avec un $P=0,019$ et la relation entre ces deux paramètres est proportionnelle avec un $R^2=0,937$, autrement dit plus la fraction est riche en glucose plus son taux d'inhibition maximale augmente et le pouvoir inhibiteur augmente, tenu compte qu'on utilisé deux polysaccharides de type de glucaneAPI et APII ont été extraites à partir des racines d'*Astragalus mongholicus* possédant une épine dorsale formée de (1-3)- β -D glucopyranosyl étudiés par Zhu *et al.*, (2011) La figure 32 explique la relation linéaire.

Le résultat obtenu confirme et valide notre résultat trouvé concernant le fort pouvoir inhibiteur de la fraction PSR qui est un glucane donc elle est très riche en glucose, par conséquent ce monosaccharide est l'un des exigences de l'activité anticomplémentaire des polysaccharides comme une multitude des études antérieures ont signalé

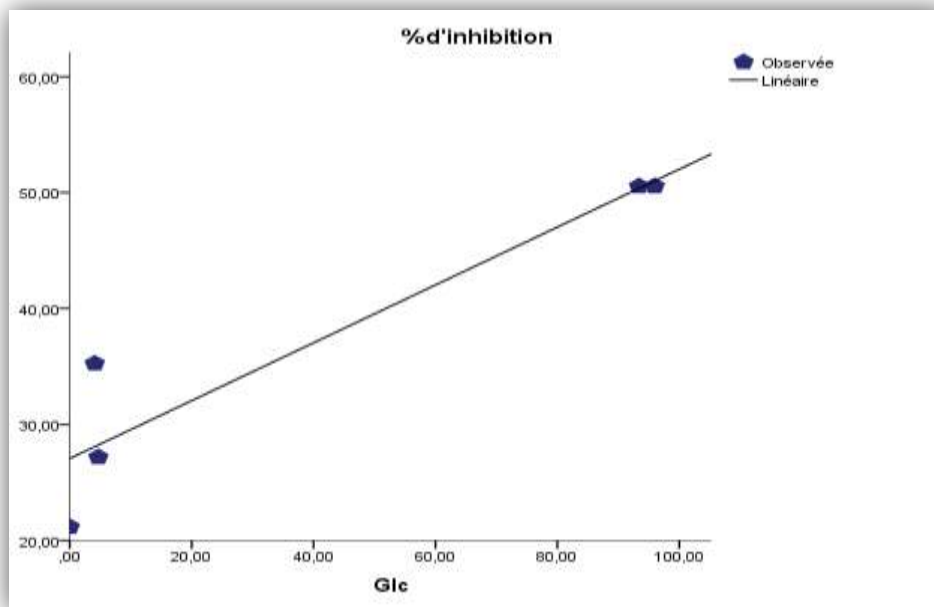


Figure 33:La courbe de la corrélation bivariée obtenue par SPSS entre la teneur en Glc et le taux d'inhibition de la fraction testée.

Encore une fois et par l'utilisation du test de corrélation bivariée traité par le programme SPSS entre deux nouveaux paramètres qui sont le taux d'inhibition maximale de la voie alterne de complément de fraction polysaccharidique testée et sa teneur en galactose cette fois-ci, on a arrivé a trouver que la teneur de la fraction polysaccharidique en galactose explique 89.2 % la variation dans taux d'inhibition maximale de la voie alterne du complément et les deux paramètres sont inversement proportionnels avec un $R^2 = 0.944$ et $P = 0.016$, ça signifie que plus la fraction polysaccharidique est très riche en galactose plus son taux d'inhibition maximale se réduit est devient relativement faible. Cela est montrée dans la figure33

Ce résultat d'analyse atteint est compatible avec notre résultat obtenu après la comparaison entre les taux d'inhibition maximales des 4 fractions qui montre que la fraction ayant la plus faible activité anticomplémentaire est **PSG** et qui la fraction la plus riche en galactose. Malgré que plusieurs rapports antérieurs ont signalé que des polysaccharides contenant dans leur structure chimique du galactose (galactanes, rhamnogalatane, galactomannane, arabinogalactane...etc) ont une activité anticcomplémentaire, mais la haute teneur en celui-ci peut affecter négativement l'activité. Dakia *et al.* (2010) ont signalé que l'augmentation (ou la force) des interactions évolue avec la diminution du nombre d'unités galactose et la distribution en bloc des galactoses dans les galactomannanes, relation

Chapitre 3 : résultats et discussion

inversement proportionnelle est considérée également comme une explication possible de la faible activité inhibitrice de la fraction PSG.

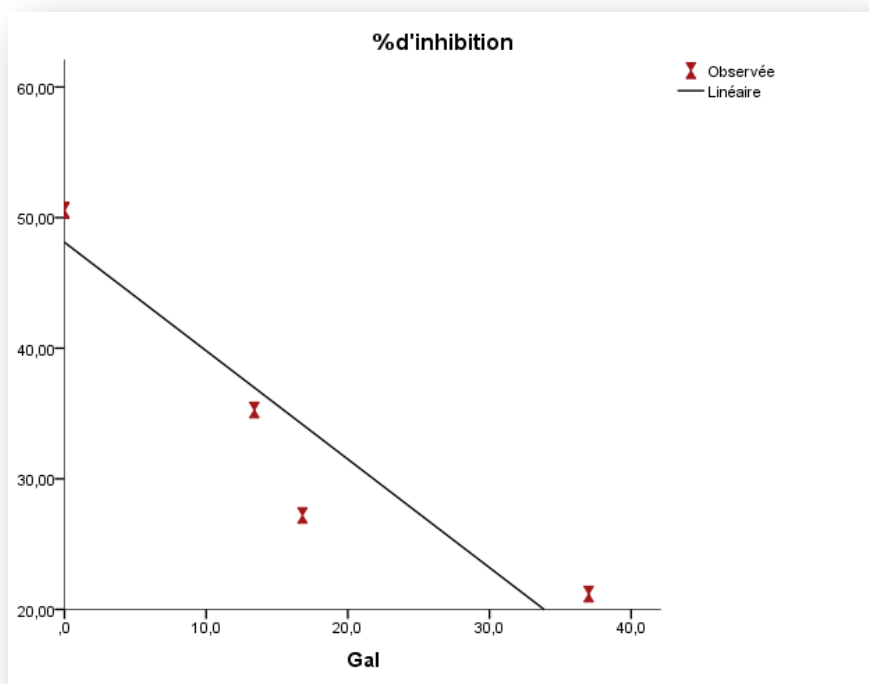


Figure 34: La courbe de la corrélation bivariée obtenue par SPSS entre la teneur en Gal et le taux d'inhibition de la fraction testée.

3.4. La bi fonctionnalité de l'héparine

L'héparine est un glycosaminoglycane poly anionique hautement sulfaté d'acide uronique et de glucosamine largement utilisé en tant que anticoagulant (Wang *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2016). Ce glycosaminoglycane poly anionique a la caractéristique d'avoir deux activités contradictoires distinctes sur le système de complément, une activité inhibitrice qui a été la plus étudiée et prouvée dans plusieurs études antérieures, et une autre activatrice qui est mal étudiée et décrite. On a essayé de prouver expérimentalement la caractéristique biphasique (inhibiteur/activateur) selon les doses de ce polysaccharide utilisées. Les résultats de cette étude sont récapitulés dans le tableau et les figures suivantes.

Tableau18: les résultats de calcul des taux de la lyse et de l'inhibition pour les deux différentes doses de l'héparine.

La dose	%d'inhibition
0,045mg/ml	88,72
1mg/ml	-48,06

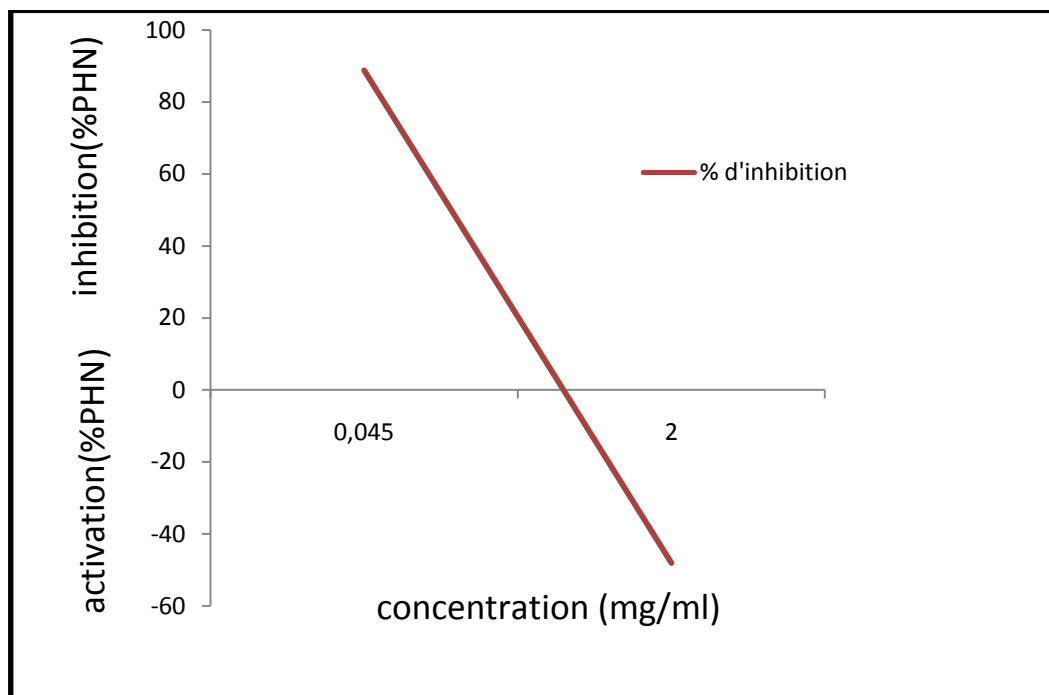


Figure 35: la courbe de taux de l'inhibition de l'héparine en fonction des deux doses utilisées.

3.4.1. L'activité inhibitrice de l'héparine

L'héparine a longtemps été reconnu comme un inhibiteur *in vitro* de l'activation du complément. Il interfère avec l'activation du complément à plusieurs stades, ou il a été rapporté que ses groupes sulfates jouent un rôle crucial dans cette activation anticcomplémentaire et même dans les activités d'anti coagulation. Cependant, peu d'études ont porté sur l'utilisation potentielle de l'héparine comme agent anticcomplément *in vivo* en raison de ses propriétés anticoagulantes, qui provoque un effet secondaire grave entraînant une dégradation des plaquettes provoquant une thrombocytopenie (Wang *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2016; Bick et Frenkel, 1999). Des présents résultats indiquent que l'activité anticcomplément de GAGS est associée à la nature poly anionique de ces polysaccharides (Cofrancesco *et al.*, 1979). De nombreuses études ont valorisé l'importance de l'existence des groupements sulfates dans la structure chimique de l'héparine sur son activité anti complémentaire.

A titre d'exemple, une fraction polysaccharidique nommée CSPS-2B constituée essentiellement des résidus de l'acide α -D galactopyranosyluronic liés entre eux par une liaison (1-4) et testée pour son activité anti complémentaire par Wang *et al.* (2012). La fraction polysaccharidique Sul-2B-2 est le dérivé sulfaté de la fraction C-2B-2, qui est sulfaté principalement en position C-2 et/ou C-3 de GalpA constitutif. Ils ont démontré que ce dérivé sulfaté possède une inhibition d'un effet plus fort que celui de l'héparine sur l'activation du

Chapitre 3 : résultats et discussion

système de complément. En revanche, le C5PS-2B-2 natif n'avait aucune inhibition. Cette observation que le l'acide uronique sulfaté de Sul-2B-2 a joué un rôle crucial dans l'activité anti-complément, correspondait à l'idée que les groupes sulfate semblaient nécessaires, bien que pas suffisants pour être requis pour l'effet anti-complémentaire de polysaccharides (Wang *et al.*, 2012). Un autre exemple qui met en valeur l'importance des groupements sulfate c'est l'étude de référence de deux polysaccharides homogènes hydrosolubles (TPSR4-2B et TPSR4-2C) qui sont des acides poly (1-4) - α -D-galactopyranosyluronic obtenus à partir de thé vert pré-infusé. Deux dérivés sulfatés d'homogalacturonanes (Sul-R4-2B et Sul-R4-2C) de TPSR4-2B et TPSR4-2C ont été préparés après sulfatation. Le test anti-complémentaire a montré que Sul-R4-2B et Sul-R4-2C manifestaient un effet inhibiteur plus fort sur l'activation du complément, par rapport à celle des polysaccharides non sulfatés et également celle de l'héparine.

En 1929, Ecker et Gross démontraient la capacité de l'héparine d'interférer avec l'activation du complément. L'utilisation de l'héparine en tant qu'inhibiteur du complément *in vivo* a été suggérée lorsque son premier effet anti complémentaire *in vitro* a été noté. Ils ont décrit l'effet inhibiteur de l'héparine sur la lyse des cellules de mouton sensibilisées dans le sérum de cobaye (Ludwig, 2009; Logue, 1977). De nombreuses études ultérieures ont indiqué que l'héparine et des GAG et oligosaccharides de structure similaire régulent de multiples étapes de la cascade du complément. Les effets les plus importants de l'héparine sur le système du complément sont les suivants:

1. Inhibition de la première étape de l'activation de la voie classique en se liant à C1q et en empêchant la formation du complexe C1 enzymatiquement actif.
2. Inhibition de la formation de la C3 convertase de la voie classique, c'est-à-dire C4bC2a, en inhibant le clivage de C2 et C4 par C1.
3. Augmentation de l'activité inhibitrice de l'inhibiteur de la C1 estérase (C1INH) sur le complexe C1 en pontant le complexe actif C1 avec C1INH.
4. Inhibition de la formation de la C3 convertase de la voie alternative, à savoir C3bBb, en altérant l'interaction entre le facteur B et C3b.
5. Inhibition de la lyse des cellules terminales en empêchant l'incorporation de composants terminaux dans le complexe d'attaque par la membrane (MAC), c'est-à-dire C5bC6C7C8).
6. Inhibition de l'angiogenèse En plus de la propagation hématogène de la tumeur (Ludwig, 2009).

Cependant, des rapports ultérieurs de tentatives visant à réduire les effets de l'activation du complément par injection d'héparine ont généralement été contradictoires. En 1949, Owren a

Chapitre 3 : résultats et discussion

traité avec de l'héparine un patient souffrant d'anémie hémolytique sévère. D'autres ont décrit les effets bénéfiques dramatiques occasionnels de l'héparine chez des patients atteints d'anémie hémolytique auto-immune. Pirofsky a également décrit plusieurs essais infructueux de traitement par l'héparine de l'anémie hémolytique auto-immune. Cependant, d'autres avaient tendance à penser que, dans le choix des patients, cette forme de traitement méritait un complément de processus d'étude clinique (Logue, 1977). En parallèle avec notre étude de l'activité anti-complémentaire des (4) fractions polysaccharidiques, et dans le cadre de l'utilisation de l'héparine comme contrôle positif comme plusieurs travaux ont fait, on a validé que ce glycoaminoglycane possède une activité anti-complémentaire dans la plage des faibles doses où la dose correspondant l'inhibition maximale de l'activation de complément est celle de 0.045mg/ml selon Wang *et al.* (2016), et c'est la dose qu'on a travaillé avec.

3.4.2. L'activité activatrice de l'héparine

La littérature scientifique est pauvre en décrivant et élucidant cette activité, mais on a arrivé à trouver expérimentalement que dans la concentration de 0.045mg/ml de l'héparine correspond à une activité inhibitrice sur l'activation de complément par la voie alterne, tandis que la concentration de 2mg/ml correspond à une activation où il devient un activateur considérable de la voie alterne de complément. Par conséquent même l'héparine possède le caractère bi phasique. Cette caractéristique bi phasique est décrite dans les travaux de Logue. (1977), qui a étudié l'effet de l'héparine sur la liaison de C3 sur la surface des érythrocytes atteinte d'une hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN); une pathologie associant une hémolyse et une prédisposition aux thromboses à cause d'un déficit des cellules hématopoïétiques en un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI), où s'ancrent les 2 protéines régulatrices du complément DAF (CD55) et la protectine (CD59) (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi, 2006).

CONCLUSION

CONCLUSION

Notre travail a été réalisé au sein de laboratoire d'immunologie de la Faculté de Médecine à l'université Kasdi Merbah Ouargla.

La capacité des quatre fractions polysaccharidiques PS1,PS2,PSG et PSR issues de différents tissus de la plante d'*Astragalus gombo* à inhiber la voie alterne du complément, autrement dit leur activité anti complémentaire a été étudiée dans la présente étude. Après la préparation des boîtes d'agarose-érythrocytaire d'AP100, on les exploite pour étudier le pouvoir inhibiteur des quatre fractions *in vitro*.

Par cette exploitation, on a réussi à prouver que les fractions polysaccharidiques étudiées possèdent ce pouvoir inhibiteur de la voie alterne du complément d'une manière dose-dépendante, cependant avec des taux d'inhibition différents entre elles. Un fort pouvoir inhibiteur sur la voie alterne de complément a été obtenu et correspond à la dose de 0,625mg/ml pour toutes les fractions polysaccharidiques (PS1, PS2, PSG, PSR). Après la comparaison entre ces taux d'inhibition on a trouvé la fraction PSR issue à partir des racines d'*Astragalus gombo* possède le pouvoir inhibiteur le plus fort. On a également prouvé la relation entre l'activité inhibitrice la composition chimique des fractions étudiées.

Perspectives

Pour avoir une idée précise sur les cibles complémentaires des quatre fractions polysaccharidiques testées, on préconise à l'utilisation des techniques plus spécifiques (PHN accomplémenté) dans le contexte d'enrichir notre étude.

Dans le cadre d'élargir les horizons de recherche scientifique, on souhaite étudier l'effet des (4) fractions étudiées sur la voie classique de complément.

L'activité anti complémentaire des quatre fractions polysaccharidiques est prouvée *in vitro* on veut connaître également leur effet *in vivo*.

On suggère des études basées sur l'effet de poids moléculaire et la composition monosaccharidique de différents extraits polysaccharidiques étudiés sur l'effet anticomplément.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amicucci, M. J., Galermo, A. G., Nandita, E., Vo, T. T. T., Liu, Y., Lee, M., ... & Lebrilla, C. B. (2019). A rapid-throughput adaptable method for determining the monosaccharide composition of polysaccharides. *International Journal of Mass Spectrometry*, 438, 22-28.
- Angone, S. A., Nguema-ona, E., et Driouich, A. La thérapie par les plantes en Afrique: activités immunostimulantes des polysaccharides de la paroi végétale. *Phytothérapie*, 2010, vol. 8, no 4, p. 223-230.
- Bedir, E., Pugh, N., Calis, I., Pasco, D., Khan, I. Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2000, vol. 23, no 7, p. 834-837.
- Bemiller, James N. *Carbohydrate chemistry for food scientists*. Elsevier, 2018.
- Boual, Z., Kemassi, A., Oudjana, A. H., Michaud, P., & Didi, O. E. H. M. (2013). Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *malva parviflora* L.(malvaceae): activité prébiotique. *Lebanese Science Journal*, 14(2), 41-51.
- Boual, Z., Pierre, G., Delattre, C. Mediterranean semi-arid plant *Astragalus armatus* as a source of bioactive galactomannan. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2015, vol. 5, no 1, p. 10-18
- Boulard, Chantal et Bencharif, Fifi. Étude comparée des érythrocytes de quatre espèces animales dans la détermination de l'activité hémolytique des voies classique et alterne du complément bovin. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 1984, vol. 7, no 1, p. 27-34.
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research*, 344(14), 1879-1900.
- Carroll, M. C., Fischer, M. B. Complement and the immune response. *Current opinion in immunology*, 1997, 9(1), 64-69.
- Chehma, A., Djebbar, M. R., Hadjaiji, F., et Rouabeh, L. Étude floristique spatio-temporelle des parcours sahariens du Sud-Est algérien. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 2005, vol. 16, no 4, p. 275-285.

Refferences bibliographiques

- Chen, G., Chen, K., Zhang, R., Chen, X., HU, P., KAN, J. Polysaccharides from bamboo shoots processing by-products: New insight into extraction and characterization. *Food chemistry*, 2018, vol. 245, p. 1113-1123.
- Chen, J., Du, Y., Zhu, F., & Chen, B. (2010). Glycogen: a novel branched polysaccharide chiral selector in CE. *Electrophoresis*, 31(6), 1044-1050.
- Chouana, T. (2017). Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bunge*.
- Chouana, T., Pierre, G., VIAL, C., Gardarin C, A., Wadouachi, D., Cailleu, D., Le Cerf., Boual, Z., Ould El Hadj, M.D., Michaud, P et Delattre, C. Structural characterization and rheological properties of a galactomannan from *Astragalus gombo Bunge* seeds harvested in Algerian Sahara. *Carbohydrate polymers*, 2017, vol. 175, p. 387-394.
- Cofrancsco, E., Radaelli, F., Pogliania, E., et al. Correlation of sulfate content and degree of carboxylation of heparin and related glycosaminoglycans with anticomplement activity. Relationships to the anticoagulant and platelet-aggregating activities. *Thrombosis research*, 1979, vol. 14, no 1, p. 179-187.
- Courtois, Josiane. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, vol. 12, no 3, p. 261-273.
- Dakia, P. A., Wathelet, B., & Paquot, M. (2010). Influence de la teneur en galactose sur les interactions moléculaires et sur les propriétés physico-chimiques des galactomannanes en solution. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(1), 213-223.
- Delattre, C., Pierre, G., Petera, B., Chouana, T., Boual, Z., Gardarin, C., ... & Michaud, P. (2017, November). De l'histoire de l'ethnobotanique en Afrique vers la découverte de nouvelles sources de polysaccharides actifs. In *Séminaire International POLYSAC 2017*.
- Deng, D., Sun, P., Yan, C., Ke, M., Jiang, X., Xiong, L., Ren, W., Hirata, K., Yamamoto, M., Fan, S., & Yan, N. (2015). Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature*, 526(7573), 391.

Refferences bibliographiques

- Diallo, Drissa, Paulsen, Berit Smestad, Liljebäck, Torun HA, *et al.* Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, vol. 74, no 2, p. 159-171.
- Dudongsheng, lu, Yan, Cheng, Zhihong, *et al.* Structure characterization novel polysaccharides isolated from the spikes of *Prunella vulgaris* and their anticomplement activities. *Journal of ethnopharmacology*, 2016, vol. 193,
- Dragon-durey, Marie-Agnès et Fremeaux-bacchi, Véronique. Déficits en protéines du complément en pathologie humaine. *La Presse Médicale*, 2006, vol. 35, no 5, p. 861-870.p. 345-353.
- Florian. H ; Lindenmeier. G; Moc. I; Berghold. C ; Sneider. N; Munster. B & Grillhòsl. C. avec la collaboration de Krüger. K ; Karamer .N; Hunischer. A ; Ackernnan. S ; Hopf. I & Wiedemann. U. (2005). Chapitre 3: Cellule et chimie- Les glucides ou hydrates de carbone. *Biochimie Humaine*. Ed : Flammarion, Paris –France. P 23-32.
- Gao, Zheng, LIU, Xinchao, Wang, Wenshuai, *et al.* Characteristic anti-inflammatory and antioxidative effects of enzymatic-and acidic-hydrolysed mycelium polysaccharides by *Oudemansiella radicata* on LPS-induced lung injury. *Carbohydrate polymers*, 2019, vol. 204, p. 142-151.
- Gasque, P., Legoedec, J., Thomas, A., Sumereau, E., Schouft, M. T., Chan, P., & Fontaine, M. Nouvelles fonctions pour le système du complément. Apport de l'étude des synthèses locales.1996
- Janeway Jr, C. A., Travers, P., Walport, M.,et Shlomchik, M. J.The complement system and innate immunity. In *Immunobiology The Immune System in Health and Disease*, 2001. 5th edition. Garland Science.
- Jia, X., Liang, Y., Zhang, C., Wang, K., Tu, Y., Chen, M., ... & He, C.. Polysaccharide prm3 from *Rhynchosia minima* root enhances immune function through tlr4-nf-kb pathway, 2018. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1862(8), 1751-1759.
- Jin, Weihua, Zhang, Wenjing, Liang, Hongze, *et al.* The structure-activity relationship between marine algae polysaccharides and anti-complement activity. *Marine drugs*, 2015, vol. 14, no 1, p. 3.

References bibliographiques

- Kashiwagi, T., Morgan, A. B., Antonucci, J. M., VanLandingham, M. R., Harris Jr, R. H., Awad, W. H., & Shields, J. R. (2003). Thermal and flammability properties of a silica–poly (methylmethacrylate) nanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science*, 89(8), 2072-2078.
- Kessous .C. (2006). Chapitre 2: Glucides. *Biochimie strécturale*. Ed, Office des publications 1, place centrale de Ben aknoun .Alger-Algérie. P 56- 80
- Kiyohara, Hiroaki, Cyong, Jong-Chol, et Yamada, Haruki. Structure and anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate research*, 1988, vol. 182, no 2, p. 259-275.
- Kolev, M., & Kemper, C. (2017). Keeping it all going—complement meets metabolism. *Frontiers in immunology*.
- Lasocka, Magdalena et Kennedy, John F. *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Michael L. Sinnott, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2007 (xviii+ 748 pp.,£ 59, ISBN: 0-85404-256-2). 2008.
- Lee, S. J., Lee, H. S., Kim, S. Y., & Shin, K. S. (2018). Immunostimulatory and anti-metastatic activity of polysaccharides isolated from byproducts of the corn starch industry. *Carbohydrate polymers*, 181, 911-917.
- Lettow, M., Mucha, E., Manz, C., Thomas, D. A., Marianski, M., Meijer, G., ...& Pagel, K. (2019). The role of the mobile proton in fucose migration. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 1-9.
- Li, R., Chen, W. C., Wang, W. P., Tian, W. Y., & Zhang, X. G. (2009). Extraction, characterization of *Astragalus* polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 738-742). Li, Chan-yi, Chen, Hong-Yuan, Liu, Wu-Ping, RUI, Wen. Multi-fingerprint profiling combined with chemometric methods for investigating the quality of *Astragalus* polysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 2019, vol. 123, p. 766-774
- Lim, Juyun, and Alexa J. Pullicin. "Oral carbohydrate sensing: Beyond sweet taste." *Physiology & behavior* (2019).
- Liu J., Willfo S. and XU C., 2015- A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, vol. 5: 31 – 61

References bibliographiques

- Logue, Gerald L. Effect of heparin on complement activation and lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red cells. *Blood*, 1977, vol. 50, no 2, p. 239-247.
- Ludwig, Ralf J. Therapeutic use of heparin beyond anticoagulation. *Current Drug Discovery Technologies*, 2009, vol. 6, no 4, p. 281-289.
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation. *Frontiers in immunology*, 6, 262.
- Morales-hernández, Jose Antonio, Singh, Abhishek K., Villanueva-rodriguez, Socorro Josefina, Castro-camus, Enrique. Hydration shells of carbohydrate polymers studied by calorimetry and terahertz spectroscopy. *Food Chemistry*, 2019
- Molho, P., & Tobelem, G. (1985). L'héparine hier et aujourd'hui. ISO 690
- Moussard, C. (2006). *Biochimie structurale et métabolique*. De Boeck Supérieur
- Murphy, K., Weaver, C., Janeway, C., & Masson, P. (2018). *Immunobiologie de Janeway (4e édition. ed.)*. Louvain-la-Neuve: De Boeck supérieur.
- Mzoughi, Zeineb, Chaouch, Mohamed Aymen, Hammi, Khaoula Mkadmini, Hafsa, jawhar, Le cerf, Didier, Ksouri, Riadh et Majdoub, Hatem. Optimization of antioxidant and antiglycated activities of polysaccharides from *Arthrocnemum indicum* leaves. *International journal of biological macromolecules*, 2018, vol. 113, p. 774-782.
- Nissilä, E., Hakala, P., Leskinen, K., Roig, A., Syed, S., van Kessel, K., ... & Chroni, A. (2018). Complement factor H and apolipoprotein E participate in regulation of inflammation in THP-1 macrophages. *Frontiers in immunology*, 9, 2701.
- Nonaka, M et Yoshizaki, F.. Evolution of the complement system. *Molecular immunology*, 2004,40(12), 897-902.
- Olasehinde, T., Mabinya, L., Olaniran, A., Okoha, A. Chemical characterization, antioxidant properties, cholinesterase inhibitory and anti-amyloidogenic activities of sulfated polysaccharides from some seaweeds. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2019, p. 100182.
- Orkin, S. H., et Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4), 631-644.

References bibliographiques

- Ouyang, Y., Han, X., Yu, Y., Chen, J., Fu, L., Zhang, F., ...& Kouta, A. Chemometric analysis of porcine, bovine and ovine heparins. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2019,164, 345-352.
- Pierre, G., Delattre, C., Benaoun, F., Chouana T., B. Petera, Gardarin, C., Vial, C., Wadouachi, A, D. Lecerf, Boual, Z., Fenoradoso, T.A. Ould EL Hadj, M.D. et Michaud P. Bioactive polysaccharides from African terrestrial plants: the importance of ethnobotany. In: 5th EPNOE International Polysaccharide Conference. 2017.
- Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (Eds.). (2015). *Polysaccharides: bioactivity and biotechnology*. Springer. Roberfroid, M. B., & Delzenne, N. M. (1998). Dietary fructans. *Annual review of nutrition*, 18(1), 117-143.
- Romo, Angel M. Contribution to the taxonomy and nomenclature of the vascular plants of Morocco. *Botanical journal of the Linnean Society*, 1992, vol. 108, no 3, p. 203-212.
- Rosain, J., Ngo, S., Bordereau, P., Poulain, N., Roncelin, S., Martins, P. V., et Frémeaux-Bacchi, V. (2014). Déficits en protéines du complément et pathologies humaines. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 72, No. 3, pp. 271-280).
- Roumenina, L. T., Loirat, C., Dragon-Durey, M. A., Halbwachs-Mecarelli, L., Sautes-Fridman, C., & Fremeaux-Bacchi, V. (2011). Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS. *Journal of immunological methods*, 365(1-2), 8-26.
- Schmitt, Christophe, Sanchez, Christian, Desobry-banon, Sylvie,et Hardy, Joël . Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1998, vol. 38, no 8, p. 689-753.
- Tachdjian, G., Brisset, S., Courtot, A. M., Schoëvaërt, D., & Tosca, L. (2016). *Embryologie et histologie humaines*. Elsevier Masson.
- Tang, Liu, Chen, Yicun, Jiang, Zebin, *et al.* Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia*

Refferences bibliographiques

- livida. *International journal of biological macromolecules*, 2017, vol. 94, p. 642-652.
- Teyeb, H., Zouari, S., Douki, W, Najjar, M.F, Neffati, M. essential oils of leaves, flowers and fruits of *Astragalus gombiformis* Pomel (Fabaceae). In : International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009 853. 2009. p. 263-268
- Teyeb, Hassen, Houta, Olfa, Douki, Wahiba et Neffati, Mohamed. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Astragalus gombo* collectée à partir de deux sites de la Tunisie. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 2012, vol. 14, p. 63-67.
- Théroux, P., & Martel, C. Complement activity and pharmacological inhibition in cardiovascular disease. (2006). *Canadian Journal of Cardiology*, 22, 18B-24B.
- Tzianabos, Arthur O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical microbiology reviews*, 2000, vol. 13, no 4, p. 523-533.
- Wang, Y ., Wu, Y., Liang, D., Bai, M., Tang, W., Bao, S., ... & Li, J. (2013). Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell stem cell*, 13(6), 659-662.
- ISO 690
- Wang, S. C., Shi, S. S., Lian, H., *et al.* Structural Features and Anti-Complement Activity of an Acidic Polysaccharide from *Forsythia suspensa*. *J. Glycom. Lipidom*, 2016, vol. 2, p. 1-8.
- Wang, H., LI, N., Zhu, Ch., et al. Anti-complementary activity of two homogeneous polysaccharides from *Eclipta prostrata*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2017, vol. 493, no 2, p. 887-893.
- Wang, J., QI, W, et Chen, G. The effect of monosaccharides on self-assembly of benzenetricarboxamides. *Chinese Chemical Letters*, 2018.

Refferences bibliographiques

- Wertz, J. L. L'amidon et le PLA: Deux Biopolymères sur le Marché. Note de Synthèse, 2011.
- Xiao, Ruiqing et Grinstaff, Mark W. Chemical synthesis of polysaccharides and polysaccharide mimetics. *Progress in Polymer Science*, 2017, vol. 74, p. 78-116.
- Yamagishi, Tatsunori, Tsuboi, Takuma, et Kikuchi, Koichi. Potent natural immunomodulator, rice water-soluble polysaccharide fractions with anticomplementary activity. *Cereal chemistry*, 2003, vol. 80, no 1, p. 5-8), 1395- 1410.
- Yamada, Haruki, Nagai, Takayuki, Cyong, Jong-Chol, et al. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. *Carbohydrate research*, 1985, vol. 144, no 1, p. 101-111.
- Zong, A., Cao, H., & Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90(4) Zhang, Ting et Chen, Daofeng. Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS. *Journal of ethnopharmacology*, 2008, vol. 117, no 2, p. 351-361.
- ISO 690
- Pendarvis, R. 1998, *Essentials of Carbohydrate Chemistry* by John F. Robyt. *The Chemical Educator* , vol. 3, no 5, p. 1-2.

ANNEXES

ANNEXE 1: Photo de modèle de boîte d'agarose poulet-érythrocytaire (AP100).



ANNEXE2: Tableau des différents composants (fragments/complexes) de système de complément avec leurs concentrations sériques.

Composant	Nomenclature
C2 (C2a/C2b) 25 µg/ml	Composant de complément 2
C3 (C3a/C3b) 1200 µg/ml	Composant de complément 3
C4 (C4a/C4b) 350 µg/ml	Composant de complément 4
C5 (C5a/C5b) 75µg/ml	Composant de complément 5
C6 70 µg/ml	Composant de complément 6
C7 60 µg/ml	Composant de complément 7
C8 80 µg/ml	Composant de complément 8
C9 60 µg/ml	Composant de complément 9
C1q (C1r, C1s) 2	Complexe C1
C3bBb	C3 convertase Alterne
C4bC2a	C3 convertase Classique/De Lectines
C3bBbC3b	C5 convertase Alterne
C4bC2aC3b	C5 convertase Classique/ De Lectines
C5bC6C7C8C9n	CAM (Complexe d'attaque membranaire)

Source:(Zewde et Morikis, 2018; FINE, 2017)

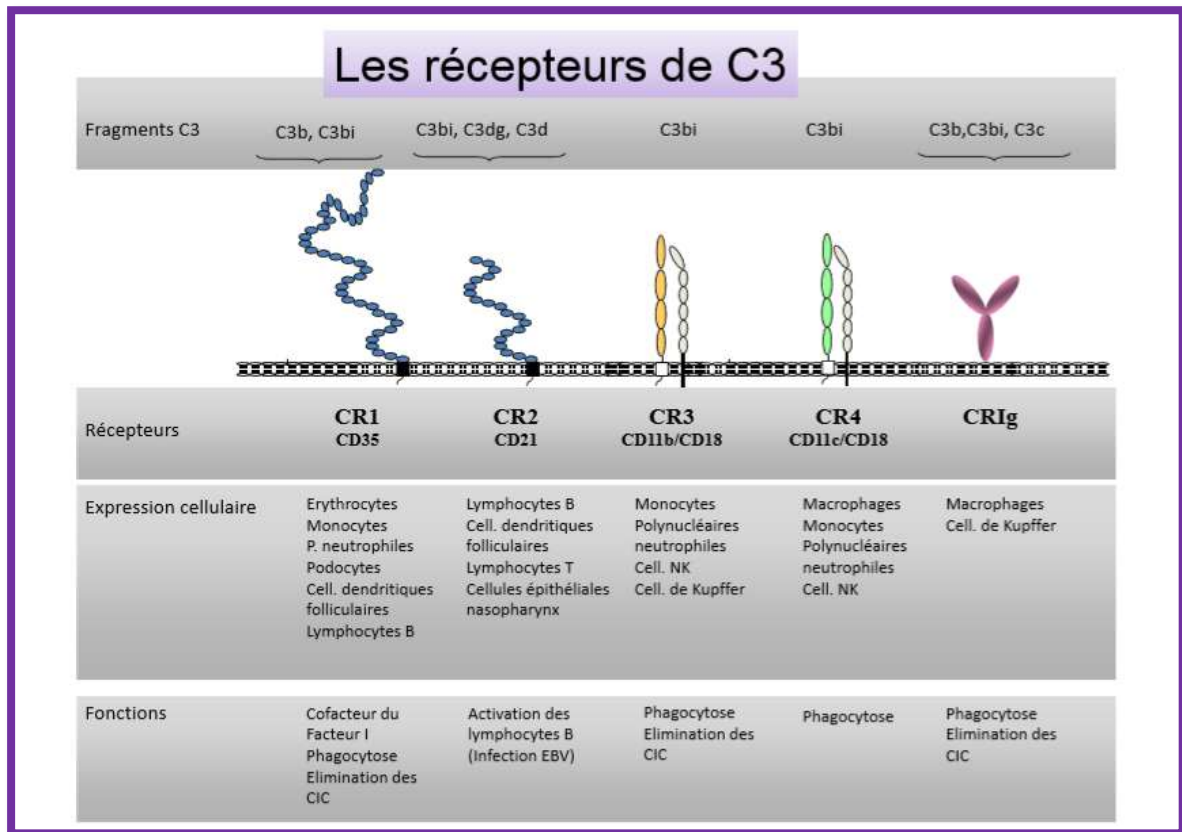
ANNEXE 3: La plante source des 4 fractions polysaccharidiques étudiées appartenant à l'espèce d'*Astragalus gombo*.

Le genre *Astragalus* contient environ 3000 espèces et représente l'un des plus grands genres de la famille de Fabaceae. Il est largement distribué tout au long des régions tempérées, les zones arides et continentales du monde. L'Algérie renferme 40 espèces de ce genre. (Chouana *et al.*, 2017; Maamira *et al.*, 2015; Teyeb *et al.*, 2012; Romo, 1992). Les espèces d'*Astragalus* sont des plantes médicinales et toxiques. Dans l'Algérie, *Astragalus gombo* est parmi les espèces connues. Cette espèce pousse dans le Sahara qui est le plus grand des déserts et le plus expressif et typique par son extrême aridité (7 millions de km²) caractérisé par des conditions édapho-climatiques très contraignantes pour la survie spontanée des êtres vivants notamment les plantes. (Chouana *et al.*, 2017; Chehma *et al.*, 2005).

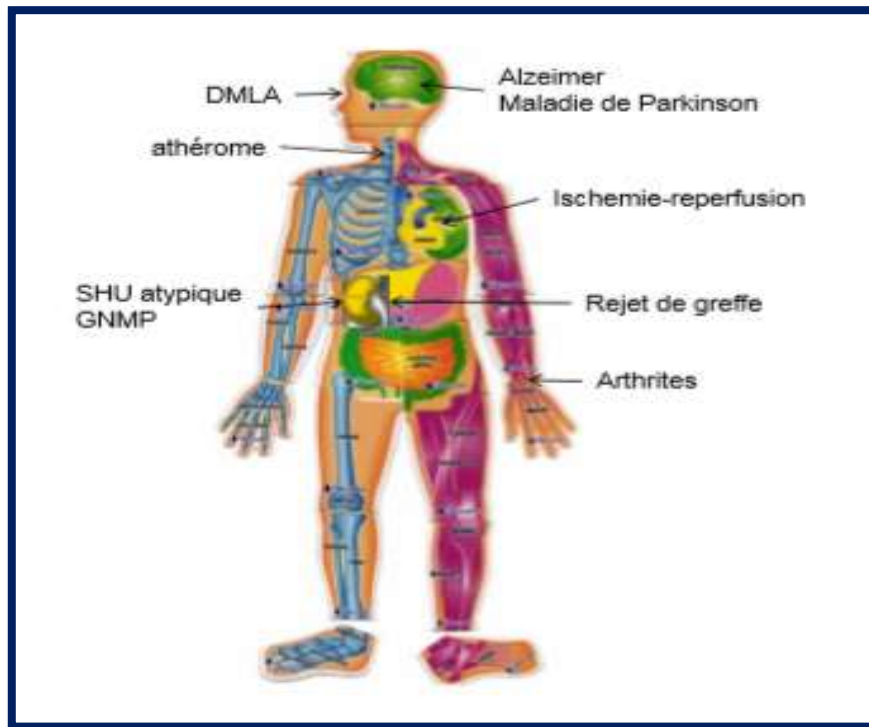
Les espèces d'*Astragalus* sont des plantes médicinales et toxiques, et beaucoup d'entre elles ont déjà été étudiées. Certaines espèces d'*Astragalus* sont utilisées comme fourrage pour le bétail et les animaux sauvages, mais beaucoup sont responsables d'intoxications aiguës et chroniques (Teyeb *et al.*, 2009).

Dans l'Algérie, *Astragalus gombo* est parmi les espèces les plus connues et étudiées. Cette espèce pousse dans le Sahara qui est le plus grand des déserts et le plus expressif et typique par son extrême aridité (7 millions de km²) caractérisé par des conditions édapho-climatiques très contraignantes pour la survie spontanée des êtres vivants notamment les plantes. Elle appartient à la famille de Fabacées, cette dernière représente avec les Astéracées, les Chénopodiacées et les Brassicacées les 4 familles renfermant plus de la moitié des espèces riches et les plus diversifiées selon une étude floristique spatio-temporelle des parcours sahariens du Sud-Est algérien notamment à Ouargla en 2005, néanmoins, cet écosystème reste un milieu vivant caractérisé par un couvert végétal très diversifié. (Chouana *et al.*, 2017; Chehma *et al.*, 2005).

ANNEXE 4: les différents récepteurs de fagment C3b.



ANNEXE 5: exemples sur les pathologies associées au système de complément.



ANNEXE 6: laboratoire d'immunologie de la faculté de médecine Ouargla.



ANNEXE 7: Tableau des valeurs de constante de variabilité (CV) des mesures calculées par Excel.

Fraction	Concentration en tube	Concentration réactionnelle	CV AP
PS1	0,3125	0,15625	10,39
	0,625	0,3125	2,99
	1,25	0,625	2,95
	2,5	1,25	0,31
	5	2,5	2,26
	10	5	3,96
PSR	0,3125	0,15625	7,79
	0,625	0,3125	2,01
	1,25	0,625	9,16
	2,5	1,25	3,84
	5	2,5	5,18
	10	5	2,83
PS2	0,3125	0,15625	9,21
	0,625	0,3125	5,53
	1,25	0,625	8,43
	2,5	1,25	2,38
	5	2,5	3,77
	10	5	3,25
PSG	0,3125	0,15625	9,78
	0,625	0,3125	7,44
	1,25	0,625	9,94
	2,5	1,25	2,66
	5	2,5	0,60
	10	5	0.13

RESUME

De nombreuses activités biologiques des polysaccharides végétaux ont été mises en évidence, telles que le antioxydantes, les antivirales, antimicrobiennes, antiparasitaires ou anti-inflammatoires, anticancéreuses et également l'activité anti-complémentaire. L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité anti-complémentaire des quatre fractions polysaccharidiques extraites à partir de différents tissus (tiges, graines, racines) d'*Astragalus gombo* par la technique hémolytique fonctionnelle AP100. Elle nous a permis de mesurer les taux d'inhibition de la voie alterne de complément (VAC) des polysaccharides PS1, PS2, PSG et PSR. Cette étude est effectuée dans des boîtes d'agarose-érythrocytaires où on a préparé des séries des dilutions pour chaque fraction polysaccharidique. On a réussi à prouver l'existence d'une capacité inhibitrice d'une manière dose-dépendante dans les fractions étudiées qui est liée à la composition monosaccharidique. La dose correspondant à l'inhibition maximale est 0,625mg/ml pour toutes les fractions. La fraction issue des racines d'*Astragalus gombo* PSRa montrée un fort pouvoir inhibiteur de la VAC (50.56%). Ce résultat s'accorde avec plusieurs études antérieures qui ont signalé l'existence d'une activité anticomplémentaire chez les polysaccharides végétaux. On peut dire que ces polysaccharides peuvent être utilisés comme des inhibiteurs thérapeutiques pertinents de VAC.

Mots clés : activité anti-complémentaire, fractions polysaccharidiques, *Astragalus gombo*, voie alterne de complément, technique AP100.

ABSTRACT

Many biological activities of plant polysaccharides have been highlighted, such as antioxidants, antivirals, antimicrobial, antiparasitic or anti-inflammatory, anti-cancer and also anti-complementary activity. The objective of our work is to study the activity anti-complementary of the four polysaccharides extracted from different tissues (stems, seeds, roots) of the *Astragalus gombo* by the the AP100 functional haemolytic technique. It allowed us to measure the complement alternative pathway (CAP) inhibition rate of PS1, PS2, PSG and PSR. This study was carried out in agarose erythrocyte plates which were prepared for each polysaccharide fraction a series of dilutions. The existence of an inhibitory capacity in a dose-dependent manner has been proved in the fractions studied and this activity is related to the monosaccharide composition. The dose corresponding to the maximum inhibition is 0.625 mg / ml for all fractions. The study of anti-complementary activity of the polysaccharide fraction .the fraction of roots PSR showed a strong inhibiting power of the CAP (50.56%). This result agrees with several previous studies that have reported the existence of anticomplementary activity in polysaccharides from plants. It could be said that these polysaccharides can be used as relevant therapeutic inhibitors of CAP.

Key words: anti-complementary activity, polysaccharide moieties, *Astragalus gombo*, alternative complement pathway, AP100 technique.

ملخص

العديد من الوظائف البيولوجية للسكريات النباتية قد اثبتت مثل مضادة للاكسدة و للفيروسات , للميكروبات , للالتهابات للسرطانات , وايضا مثبطة لجهاز المتمم. الهدف من عملنا هو دراسة تثبيط نشاط جهاز المتمم وذلك باستخدام اربع سكريات مستخلصة من اجزاء مختلفة (الساق , البذور والجزور) من نبتة (*Astragalus gombo*) هذه التقنية سمحت لنا بقياس نسبة تثبيط المسلك البديل لجهاز المتمم للسكريات PS1, PS2, PSR, PSG. أجريت هذه الدراسة باستخدام علب الاغاروز -الكريات الدموية الحمراء حيث تم إعداد سلسلة تخفيف لكل سكري. لقد اثبتنا وجود قدرة مثبطة للمسلك البديل لجهاز المتمم من طرف السكريات الأربعة ولاحظنا وجود علاقة طردية بين التركيز ونسبة التثبيط. التركيز 0.625 ملغ / مل يوافق أعلى نسبة تثبيط لنشاط المتمم للسكريات الأربعة وهذا التثبيط راجع الى السكريات الاحادية المكونة لهذه السكريات الأربعة. السكري المستخلص من الجزور (PSR) اثبت وجود قوة تثبيطية عالية لنشاط المتمم التي توافق (50.56%). هذه النتائج تتوافق مع عدة دراسات سابقة اشارت الى وجود قدرة مثبطة لنشاط جهاز المتمم من طرف السكريات النباتية. يمكن ان نقول ان هذه السكريات يمكن ان تستخدم كمثبطات علاجية لنشاط المتمم بصفة خاصة للمسلك البديل.

الكلمات المفتاحية: تثبيط نشاط جهاز المتمم، السكريات الأربعة، *Astragalus gombo*، المسلك البديل، تقنية AP100.