



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



**UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département des Sciences Biologiques**

**Mémoire**  
**MASTER ACADEMIQUE**  
**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Biologie**

**Spécialité : Biochimie**

**appliquée**

Présenté par :

**Mlles BEZZIOU Nour El Houda et KHELFAOUI Khaoula**

Etude de la composition biochimique et activités biologiques de  
polysaccharides de *Terfezia arenaria* (Terfes rouge) récoltées dans  
le Sahara Est algérien

Soutenu publiquement

**Le : 30/05/2016**

Devant le jury :

Président	MIMOUNI Yamina	MCB	Univ. Ouargla
Encadreur	BOUAL Zakaria	MCA	Univ. Ouargla
Co-Encadreur	BRADAI Lyes	MCA	Univ. Ouargla
Examineur	BAYOUSSEF Zahia	MCB	Univ. Ouargla

**Année Universitaire : 2015/2016**

## *Remerciements*

*Nous remercions avant tout "le bon Dieu " tout puissant qui nous a accordé la volonté et la force d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous voudrions remercier du fond du cœur Monsieur BOUAL Zakaria, Maître de conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui a encadré cette étude au quotidien. Il fut toujours présente, en particulier lorsque nous nous sommes confrontées au doute, nous lui sommes reconnaissantes pour : son ouverture d'esprit, son dynamisme et son optimisme, ainsi que pour ses multiples et précieux conseils scientifiques, professionnels.*

*Nous voudrions remercier BRADAILYAS, Maître de conférence à l'université de OUARGLA pour son aide pour la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury :*

*Au président du jury, Docteur MIMOUNI YAMINA, responsable de la spécialité de biochimie de l'Université Kasdi MERBAH d'OUARGLA, Qui nous a faite l'honneur de présider ce jury.*

*À Madame BAYOUSEF ZAHIA., docteur à l'Université KASDI MERBAH OUARGLA de nous avoir honoré en acceptant de faire partie de ce jury. Veuillez trouver ici notre remerciement les plus sincères.*

*Nous remercions le Laboratoire d'analyse médical « IBN ROCHD » Ghardaïa, de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.*

*Je voudrais remercier l'ensemble des personnes, qui nous 'ont aidé, de près ou de loin, à réaliser ce travail.*

*Toute ma gratitude à mes collègues de promotion ainsi qu'à d'autres étudiants.*

## Dédicace



*A ma mère **Habiba** qui m'a élevé, éduqué et m'a constitué les actes les plus nobles de la vie. Elle m'a Grandi dans un environnement sain, avec toutes les qualités humaines. Ma force, ma persévérance c'est à toi maman que je le dois et ma réussite aussi. Tu as su inculquer à tes enfants l'esprit de partage, l'honnêteté et le travail. Ce travail est le fruit de tes efforts et de tes sacrifices. Merci pour tout et que Dieu t'accorde longue vie pour qu'à mon tour je puisse te témoigner ma gratitude. Amin*

*A l'âme de mon cher père **Aissa** qui nous a quittés il y'a des années. J'aurai bien voulu que tu sois là pour assister à ce jour mémorable de ma vie. Mais Allah t'a plutôt rappelé auprès de lui, c'est aussi ça la volonté divine. Il est toujours présente dans mon cœur, était toujours souriant, toujours de bonne humeur, disponible et attentive. Voilà ta petite fille aussi devenir ce que tu as voulu qu'elle soit.*

*Puis je dédie ce travail*

*A ma cher oncle **Kaddour** qui était avec sa soutien moral et matériel derrière toutes mes réussites depuis l'école primaire jusqu'à ce jour. Et à ma chère tante **Aicha** qui était ma deuxième maman.*

*A Mes chers frères **Aziz** et **Farouk** qui m'encourageaient toujours et me soutenaient leur présence auprès de moi.*

*A mes grandes mère **Masseouda**, **Marzaka**. Et à ma frère épouse **Masseouda** et à ma petite princesse **Alaa** et mes princes **Ahmed**, **Aissa** et **Adam**.*

*A Tous mes tantes principalement **Souad** et **Hanane**, mes cousins et mes cousines surtout **Soumia** et **Yousra**.*

*A tous les membres de la famille **BEZZIOU**.*

*À tous mes professeurs du primaire jusqu'au universitaire particulièrement Mr **Zakaria BOUAL**.*

*À mon binôme et amie de travail **KHELFAOUI Khaoula**, merci pour ta patient,*

*A mes amies de ma vie et mes sœurs **Bachorti** et **Safsofti**.*

*A tous mes camarades de promotion de master II biochimie 2015- 2016 surtout **Mohammed**, **Soriya**, **masseouda** ... Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.*

*Nour el houda*



# Dédicace



À mes parents qui m'ont donné la naissance et la croyance religieuse  
À ma mère SALIHA, un grand merci, même si ce mot ne suffit pas à  
Rendre tout bien qu'elle m'a fait et qu'elle continue à m'apporter ; qui ne  
cesse de m'orienter.

À mon père MOHAMMED NACER qui m'a élevé, éduqué et m'a  
donné les actes les plus nobles de la vie pour grandir dans un environnement  
sain.

À mes sœurs KAOUTHAR et MERIEM ARAFA.

À mes frères MOHAMMED ABD ELBASSET, AHMED MOUSSA

Et le petit prince MOHAMMED AMJAD

À tous les membres de la grande famille KHELFAOUI.

À mes chères cousines IMANE et RAMLA.

À mon binôme et amie de travail BEZZIOU NOUR ELHOUDA.

À tous mes professeurs particulièrement Mr ZAKARIA BOUAL  
À mes chères amies AICHA, AIDA, SAFIA, BOUCHRA, NOUR  
ELHOUDA, ZINEB, NAIMA, SOUMAIYA, SARA et ASMA....,

À toute la promotion de Master (2015-2016), surtout promotion  
biochimie appliquée

Tous mes professeurs du primaire jusqu'au universitaire

À tous les collègues de près et de loin.

À tous ceux qui utilisent la science pour le bonheur et la prospérité de  
l'humanité.

Je dédie cet humble travail

KHAOULA

## Liste des tableaux

Tableau 1.- Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation.....	15
Tableau 2.- Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation.....	17
Tableau 3.- Préparation des étalons de glucose (NADOUR, 2015).....	25
Tableau 4.- Composition de PBS selon BURNAT <i>et al.</i> (2013).....	40
Tableau 5.- Composition de solution Hanks selon HANKS (1975) .....	41
Tableau 6.- Test de phagocytose .....	43
Tableau 7.- Composition physico-chimique et biochimique du matériel d'étude.....	50
Tableau 8.- Rendement et compositions de polysaccharides hydrosolubles de <i>T. arenaria</i> .....	53
Tableau 9.- Résultats de CCM de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble obtenus et les différents étalons utilisés dans les quatre systèmes.....	55

## Liste des figures

Figure 1.- Différentes étapes de l'extraction des polysaccharides hydro et alcalisolubles de <i>Terfezia arenaria</i> .....	27
Figure 2.- Réduction de radical cation ABTS <sup>•+</sup> par l'agent antioxydant.....	36
Figure 3.- Réduction de radical libre DPPH <sup>•</sup> par l'agent antioxydant .....	38
Figure 4.- Différentes étapes du test de phagocytose.....	47
Figure 5.- Chromatogramme de deux extraits polysaccharidiques et méthanoliques de <i>Terfezia arenaria</i> dans les 04 systèmes par CCM.....	56
Figure 6.- Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations de <i>T. arenaria</i> . .....	60
Figure 7.- Pourcentage d'inhibition de radical libre ABTS en fonction des concentrations de <i>T. arenaria</i> . .....	60
Figure 8.- Capacité phagocytaire de l'extrait polysaccharidique de <i>T. arenaria</i> . .....	61
Figure 9.- Activité phagocytaire d'extrait de polysaccharides hydrosoluble de <i>T. arenaria</i> . .....	62
Figure 10.- Activité inhibitrice de l'enzyme $\alpha$ -glucosidase par l'acarbose et les polysaccharides de <i>T. arenaria</i> .....	64

## Liste des photos

Photo 1.- <i>Terfezia arenaria</i> (Terfeziaceae).....	14
Photo 2.- Observation microscopique de la phagocytose de <i>Candida albicans</i> en présence de polysaccharide de <i>T. arenaria</i> (x 1000) (Photo originale) .....	63

## Table des matières

Remerciement	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Listes des abréviations	
Table des matières	
Introduction.....	1

### Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1.- Généralité sur les truffes .....	4
I.2.- Taxonomie des truffes .....	5
I.3.- Importance des truffes .....	6
I.4.- Composition des truffes: .....	7
I.5.- Activités biologiques des polysaccharides des champignons .....	8

### Chapitre II: Matériels et méthodes

II.1.- Principe d'étude .....	12
II.2.- Matériel d'étude .....	12
II.2.1.- Matériel biologique .....	12
II.2.2.1- choix de l'espèce .....	12
II.2.2.2.- Position systématique .....	13
II.2.2.3.-Répartition géographique .....	13
II.2.2.4.- Récolte, séchage et broyage de <i>Terfezia arenaria</i> .....	13
II.2.2.- Produits et appareillage utilisés .....	14
II.3.- Analyses physico-chimiques et biochimiques de <i>Terfezia arenaria</i> .....	19

II.3.1.-Dosage des cendres .....	19
II.3.2.- Dosage des sels minéraux .....	20
II.3.3.- Détermination de l'Acidité titrable .....	20
II.3.4.- Dosage des lipides .....	21
II.3.5.- Dosage des protéines par la méthode de BRADFORD.....	22
II.3.6.- Dosage des polyphénols totaux .....	23
II.3.7.- Dosage des flavonoïdes .....	23
II.3.8.- Dosage des sucres réducteurs à l'acide bicinchoninique.....	24
II.4.-Etude des polysaccharides de <i>Terfezia arenaria</i> .....	25
II.4.1.- Extraction des polysaccharides hydro et alcalisolubles de <i>Terfezia arenaria</i> (Protocole modifié) .....	25
II.4.2.- Composition de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles.....	27
II.4.2.1.- Dosage des oses totaux .....	28
II.4.2.2.- Dosage des oses neutres .....	28
II.4.2.3.- Dosage des oses acides .....	29
II.4.3.- Caractérisation des résidus glycosidiques .....	31
II.4.- Activités biologiques d'extrait polysaccharidique.....	35
II.4.1.- Activité antioxydante .....	35
II.4.1.1.- Test d'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) .....	35
II.4.1.2.- Test du radical 2,2'-diphenyl picrylhydrazyle (DPPH) .....	37
II.4.2.- Activité phagocytaire .....	39
II.4.2.1.- Principe de test.....	39



II.4.2.2.- Prélèvement de sang .....	39
II.4.2.3.- Préparation de <i>Candida albicans</i> .....	39
II.4.2.4.- Préparation des solutions tampons .....	40
II.4.3.5.- Préparation de polysaccharides .....	42
II.4.3.6.- Préparation de zymosan.....	42
II.4.3.7.- Exploration de la phagocytose et récupération des cellules phagocytaires (protocole modifié).....	42
II.4.3.8.- Lyse des érythrocytes .....	43
II.4.3.9.- Préparation de frottis sur lame.....	44
II.4.3.10.- Fixation par le méthanol.....	44
II.4.3.11.- Coloration de MGG .....	44
II.4.3.12.- Lecture du frottis sous microscope.....	45
II.4.3.13.- Calcul de la capacité phagocytaire .....	45
II.4.3.14.- Calcul de l'activité phagocytaire .....	46
II.4.3.- Activité antidiabétique .....	48
II.4.3.1.- Principe.....	48
II.4.3.2.-Mode opératoire.....	48

### **Chapitre III: Résultats et discussions**

III.1.- Caractérisations physico-chimiques et biochimiques de <i>Terfezia arenaria</i> .....	50
III.2.- Composition de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble .....	53
III.3.- Caractérisation par CCM des oses constitutifs de l'extrait méthanolique et de polysaccharides.....	54
III.4.- Activités biologiques des polysaccharides .....	58
III.4.1.- Activités antioxydantes.....	58

III.4.2.- Activité phagocytaire .....	61
III.3.3.- Activité antidiabétique .....	63
Conclusion .....	66
Références bibliographiques .....	67
Annexes	

# *Introduction*

---

---

Les champignons sont extrêmement variés et abondants, ils se développent partout dans le monde et même dans les endroits les plus inhospitaliers (SHAVIT et SHAVIT, 2014). Plus de 2000 ans, Les champignons sont appréciés et consommés pour leurs valeurs nutritives et leurs propriétés médicinales (MORADALI *et al.*, 2007).

Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont évalué l'importance des champignons (WU *et al.*, 2013) en raison de leurs richesses en nombreux composants bioactifs qui contribuent à la valeur nutritive, pharmaceutique et industrielle (CHEUNG *et al.*, 2003 ; ZHANG *et al.*, 2014).

Les truffes du désert est parmi les différents champignons sauvages connus dans le monde (WANG *et al.*, 2011), qui sont nommés aussi Terfez. Ce sont des ascomycètes hypogés, comestibles et très appréciée à l'échelle mondiale. Leur répartition géographique était limitée aux zones arides et semi-arides (SLAMA *et al.*, 2012 ; BRADAI *et al.*, 2013).

La popularité de truffes désertiques est due à leur valeur nutritive et le goût délicieux (AL-LAITH, 2010). Elles ont été l'une des formes les plus anciennes de la nourriture et sont utilisées comme un substitut de viande (SHAH ABDUL MAJID *et al.*, 2016). En plus de leurs importances nutritionnelles, on peut les considérer comme une autre source inexploitée de composés thérapeutiques sans effets nocifs ou toxiques (AL-ALAWI, 2009 ; HAMZA *et al.*, 2013).

L'utilisation de jus de truffes pendant des siècles, pour traiter les maladies de l'œil et des lésions de la peau, ont poussées la recherche scientifique moderne à étudier leurs compositions et leurs propriétés bioactives (SHAVIT et SHAVIT, 2014).

BRADAI *et al.* (2015), montre que les glucides sont l'un des composants majoritaires des truffes désertiques. Durant les deux dernières décennies, les chercheurs ont réévalué l'importance des glucides et, envisagent pour eux de nombreuses applications notamment dans le secteur biomédical, en raison de leur large spectre de propriétés thérapeutiques, de leur abondance, de leurs sources renouvelables, non-toxiques et biodégradables (BOUAL, 2014).

Plusieurs études montrent que les polysaccharides de champignons comestibles forment une classe importante de composés bioactifs avec un large éventail d'activités

pharmacologiques. Elles ont une grande capacité de transporter les informations biologiques en raison de leurs grandes variabilités structurales (ZHANG *et al.*, 2007). Certains de leurs activités comprennent les activités antiathérogènes, activités antioxydantes, anticoagulantes, immunomodulatrices, antitumorales, anti-inflammatoires et hépatoprotectrices (GUILLAMON *et al.*, 2010 ; RUTHES *et al.*, 2015).

Le type de polysaccharide le plus répandu dans les champignons comestibles se compose de D-glucanes, néanmoins, d'autres polysaccharides, tels que hétérogalactanes ou hétéromannanes, ou encore les complexes de polysaccharide-protéine peuvent également être trouvés (SYNYTSYA et NOVAK, 2014).

Les polysaccharides de *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, et *Tricholoma matsutake*, possèdent des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité de piégeage des radicaux. Ces polysaccharides ont un très peu ou pas des effets secondaires toxiques par rapport à des antioxydants synthétiques (LI *et al.*, 2007; TSENG *et al.*, 2008 ; DING *et al.*, 2010).

En revanche, le traitement par les polysaccharides de *Poria Cocos* induisent de manière significative la production de NO et la transcription d'iNOS par l'activation de NF-kB / Rel dans la lignée de macrophages (SUN, 2014).

En outre, les polysaccharides isolés à partir des champignons, y compris les mycéliums de *Cordyceps sp.*, présentent une activité antidiabétique. Elles ont la capacité d'inhiber l'activité de l'enzyme alpha-glucosidase et par conséquent elles diminuent le taux de la glycémie (LI *et al.*, 2006). Actuellement, il y a des inhibiteurs synthétiques efficaces pour contrôler l'hyperglycémie chez les patients diabétiques mais ces médicaments ont des effets secondaires chez l'Homme (ZHU *et al.*, 2016).

YANG *et al.* (2012) ont étudié les propriétés inhibitrices de  $\alpha$ -glucosidase des fractions polysaccharidiques ePS-F2-1, ePS-F3-1 et ePS-F4-1 purifiés à partir de *Coriolus versicolor*. Ils ont trouvé que la fraction ePS-F4-1 présente un effet d'inhibition le plus important.

Au Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde possédant dans sa partie Nord le Sahara septentrional, des flores spontanées qui sont encore mal connues et méritent une attention particulière (BOUHADJERA, 2005). Terfeziaceae est l'une des familles réputées dans cette zone saharienne (GOUZI *et al.*, 2013).

Toutefois, aucune étude sur les polysaccharides et leurs effets biologiques, ne porte sur les truffes désertiques à caractère médicinal, utilisées par les populations autochtones de la région de Sahara septentrional Est algérien.

A cet effet, le présent travail s'oriente sur l'étude de la composition biochimique de *Terfezia arenaria* (terfèz rouge), qui est parmi les différentes truffes comestibles connues dans l'Algérie (BRADAI *et al.*, 2015), mais aussi caractériser et tester les activités biologiques de leurs polysaccharides en élargissant son spectre d'exploitation dans le domaine biomédical.

Le document est structuré en trois chapitres. Les caractérisations de truffes et de champignons comestibles sont brièvement décrites dans le premier chapitre et incluent des faits majeurs sur la taxonomie, l'importance et les effets biologiques de polysaccharides de champignons.

Le deuxième chapitre, aborde ensuite la partie expérimentale, en déterminant les compositions physico-chimiques de *Terfezia arenaria*, en décrivant les principales étapes d'extraction de polysaccharides hydro-alcalisolubles, en limitant leur composition globale et en caractérisant les résidus glycosidiques par CCM. Une étude biologique des extraits polysaccharidiques concernant l'activité antioxydante, phagocytaire et antidiabétique.

La troisième partie regroupe les principaux résultats obtenus, suivi d'une discussion les, et enfin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achèvent ce travail.

# *Chapitre I.-*

---

## *Synthèse bibliographique*

### I.1.- Généralité sur les truffes

Truffe, également connus sous le nom « diamant noire » (TANG *et al.*, 2008) est un champignon ascomycète hypogé et mycorhizien, appartenant au genre *Tuber*, comestible (LIU *et al.*, 2008 ; BRADAI, 2014 ; TANG *et al.*, 2008) et très appréciée à l'échelle mondiale (BRADAI, 2014). Les truffes vivent en symbiose enformant souvent, avec les racines des plantes vasculaires des mycorhizes (BRADAI, 2014) notamment les plantes appartenant à la famille des Cistacées (KERMANI, 2013) afin d'accomplir leur cycle de vie (LIU *et al.*, 2008).

Leur forme est généralement globuleuse, avec une face extérieure ridée (COSTA *et al.*, 2014).

Le mot *terraetufule*, premier terme donné pour désigner la truffe, est issu de la ressemblance physique entre la truffe et le tuf qui constitue une pierre poreuse typique de l'Italie centrale. Par la suite, ce mot fut transformé en « tertufole » et « tartufo » en Italie, « truffe » en France, « trüffel » en Allemagne, truffle en Angleterre (BRADAI, 2014).

En arabe, les truffes sont connus sous le nom de Al-kamah ou kamaa, en Algérie, les truffes de désert appelées « Terfès, terfez, torfès et kama », elles sont aussi connues sous le nom de Al-Kamah, Al-Faga'a, Kholassi ou Zubaidi selon les dialectes locaux (KAGAN-ZUR *et al.*, 2013).

Aucun environnement n'est requis pour les truffes (SARITHA *et al.*, 2016) mais leur répartition géographique étaient limitées aux zones arides et semi-arides, principalement dans les pays du bassin méditerranéen (HAMZA *et al.*, 2013), en Iraq, Koweït, le Sahara, l'Arabie Saoudite et une partie du Maghreb (KHANAQA, 2006), où la plupart sont de genre *Terfazia* et *Tirmania*, ces derniers aussi nommés « truffes du désert » (WANG et MARCONE, 2011).

En outre, certaines espèces de truffes ont été trouvées en Europe (MIAO *et al.*, 2011), principalement le genre *Tuber* : *Tuber albidum*, *T. asa*, *T. excavatum*, *T. rufum*, *T. uncinatum* (DENNOUNI, 1996), en Afrique du Sud, en Amérique du Nord, au Japon et en Chine (HAMZA *et al.*, 2013).

Le genre *Tuber* se développe sous des climats tempérés qui présentent une alternance de saisons, l'éventail des amplitudes que peuvent prendre les variables climatiques des zones



truffières est important. La truffe genre *Tuber* se trouve généralement entre les 44° et 47° de latitude Nord et 100 à 1000 mètres d'altitude (BRADAI, 2014).

Alors que, le développement des truffes dans les déserts chauds se produit après la chute des pluies qui annoncent la fin de l'hiver et le début de la saison chaude, avec une répartition temporelle spécifique de quantités de précipitations le long de l'année, mais aussi en fonction du type de sol, de climat et l'abondance des plantes hôtes. en général, la répartition des espèces de truffe est étroitement liée aux conditions climatiques et édaphiques (BRADAI *et al.*, 2015).

## I.2.- Taxonomie des truffes

Il existe plus de 60 types de truffes dans le monde (LIU *et al.*, 2008) qui sont généralement des Ascomycètes, c'est-à-dire que leurs spores sont produites dans les asques. Elles font partie des Discomycètes au sein des Euascomycètes.

En effet, les truffes sont classées dans un premier temps, avec d'autres champignons hypogés comme les Terfeziaceae, dans un ordre distinct des Pezizales : l'ordre des Tubérales dont la classification est à partir des analyses morphologiques et les similitudes de formes rencontrées pour les ascocarpes hypogés (MURAT-FURMINIEUX, 2004 ; BRADAI, 2014).

Selon BRADAI (2014) le genre *Tuber* fait maintenant partie de la famille des Tuberaceae classées dans l'ordre des Pezizales.

Taxonomiquement, la truffe appartient (Trappe, 1979) :

- **Règne:** Fungi.
- **Embranchement:** Septomycota.
- **Sous embranchement:** Ascomycotina.
- **Classe:** Euascomycètes (Eutuniquées).
- **Sous classe:** Discomycetidae.
- **Ordre:** Tubérales.
- **Famille:** Tuberaceae.
- **Genre:** *Tuber*

### I.3.- Importance des truffes

Les truffes sont considérées comme l'une des formes les plus anciennes de la nourriture (ABDUL MAJID *et al.*, 2016), en particulier dans les régions arides (BRADAI *et al.*, 2015), elles sont utilisées comme un substitut de viande et consommé en grandes quantités en raison (ABDUL MAJID *et al.*, 2016) de leur valeur nutritive, de leur goût très délicieux et de leur arôme musqué (ABDUL MAJID *et al.*, 2016 ; HAMZA *et al.*, 2013). Elles ont un profil nutritionnel unique d'acide gras insaturé, des vitamines, des minéraux et des protéines (ABDUL MAJID *et al.*, 2016).

Le goût et l'arôme typique des truffes est le résultat d'une combinaison inimitable de plusieurs composés organiques volatils, tels que les aldéhydes, les alcools, les cétones, les acides organiques et des composés soufrés (LIU *et al.*, 2008). COSTA *et al.* (2014) sont encore indiqués que les constituants chimiques de ces champignons sont considérés comme responsables de leur arôme typique.

Le bis(méthylthio)méthane, l'hexanal, le 2et 3-méthylbutanal (aldéhyde) ont été signalés en tant que des composés quantitativement prédominantes du fraction volatile des truffes, ainsi que l'éthanol, le sulfure de diméthyle, l'acétaldéhyde, l'acétone et le 1-propanol, avec des fluctuations quantitatives et qualitatives en fonction des variables telles que le type et l'origine géographique de la truffe (COSTA *et al.*, 2014).

Cependant que, les composés contenant le soufre ainsi qu'une liste des terpénoïdes, ont été rapportés comme volatiles discriminants liés à l'origine géographique (COSTA *et al.*, 2014).

En effet, plus de leur valeur nutritionnelle et leur goût très apprécié, les truffes ont également des propriétés curatives (TANG *et al.*, 2008). Elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des yeux (ABDUL MAJID *et al.*, 2016).

KAGAN-ZUR *et al.* (2013) ont signalé que le jus de truffe du désert, notamment de *Tirmania nivea*, *Terfezia claveryi* et *Terfezia boudieri*, est utilisé dans le Moyen-Orient pour traiter les maladies des yeux et de la peau. Ils ont montrés également, que dans le Kalahari africain, où la truffe est connue sous le nom « Mahupu » dans la langue setswana du Botswana, est utilisé pour induire la naissance chez les humains et le bétail. Le philosophe et le médecin persan « Ibn Sina » a recommandé l'utilisation de truffes du désert comme un remède pour un

certain nombre de maux, tels que la faiblesse, les vomissements et les plaies (KAGAN-ZUR *et al.*, 2013).

Des études récentes (KAGAN-ZUR *et al.*, 2013) montrent que les truffes représentent une source des composés thérapeutiques avec des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, antimicrobiennes, immunosuppresseurs, antimutagènes et les propriétés anti-cancérigènes vaste mais non encore largement exploité (HAMZA *et al.*, 2013).

En outre, des nouvelles études sur les propriétés bioactives des truffes du désert ont également indiqué la présence d'activité antimicrobienne, antivirale, antimutagène, hépatoprotecteur, et des propriétés anti-inflammatoires (KAGAN-ZUR *et al.*, 2013).

D'autre part, les truffes sont les champignons les plus chères du monde (WANG et MARCONE, 2011) donc d'un intérêt économique (MURAT-FURMINIEUX, 2004) très important (BOA, 2004), notamment le genre *Tuber* et *Terfezia* connus comme excellents champignons comestibles (HAMZA *et al.*, 2013).

Le prix de la truffe a dépassé les 1000 euros (680 £) par kilogramme (LIU *et al.*, 2008). En Arabie Saoudite le coût d'un kg de truffes atteint jusqu'à 200 riyals saoudiens (55 \$) cependant qu'en France, le prix de la truffe avait atteint jusqu'à 200 \$ en 1984 (BOKHARY *et al.*, 1987). Le coût élevé de la truffe est peut être due à leur carence et à leur rareté pendant la mauvaise saison de récolte (BOKHARY *et al.*, 1987).

#### **I.4.- Composition des truffes**

Les compositions chimiques d'une même espèce de truffes diffèrent selon leur région de récolte. Cette diversité est probablement due aux nombreux facteurs environnementaux tels que la quantité de pluie, le temps, les types de sols et les changements climatiques (ABDUL MAJID *et al.*, 2016).

En général (GUILLAMON *et al.*, 2010), les truffes sont très riches en glucides, en protéines avec un contenu important d'acide aminés (DENNOUNI, 1996) notamment la méthionine, cystéine, et lysine. Elles contiennent 72% d'eau et 7,6% de fibres, elles sont riches en minéraux tels que le Phosphore, le Calcium, le Magnésium, le Potassium, le Sodium, le Fer, le Zinc, le Soufre, le chlore et le Silicium (SARITHA *et al.*, 2016). Selon KAGAN-ZUR *et al.* (2013) et QHANAQA (2006) la teneur en protéines de truffes varie de 19,59 à 27,18%, de 2,81

à 7,42% d'acides gras, 7,2 à 13,02% de fibre brute, 4,64 à 6,39% de cendres et de 1,5 à 5,1 mg/100g d'acide ascorbique à partir de 20% de matière sèche.

Ainsi, la matière sèche des truffes du désert est composée de 20-27% de protéines, 3-7,5% d'acide gras saturé et insaturé, 60% de glucides et 7-13% de fibre avec 2-5mg/100g d'acide ascorbique (KAGAN-ZUR *et al.*, 2013).

### **I.5.- Activités biologiques des polysaccharides des champignons**

Au cours des dernières décennies, les champignons ont fait l'objet d'un intérêt croissant en raison (SANCHEZ, 2006) de leurs propriétés médicinales (SINGDEVSACHAN *et al.*, 2016 ; FERREIRA *et al.*, 2010 ; SANCHEZ, 2006 ; DE SILVA *et al.*, 2013).

En effet, ils constituent une source d'agents bioactifs y compris les polypeptides, les protéines, les polysaccharides, les polyphénols et les fibres (LI et SHAH, 2015 ; SINGDEVSACHAN *et al.*, 2016 ;SANCHEZ, 2006) ayant plusieurs propriétés thérapeutiques telles que des propriétés anti-inflammatoires, antihistaminiques, antitumorales, hypocholestérolémiantes, antidiabétiques, analgésiques et immunomodulatrices (SINGDEVSACHAN *et al.*, 2016 ;SANCHEZ, 2006).

Récemment (SINGDEVSACHAN *et al.*, 2016), plusieurs polysaccharides fongiques ont en effet la particularité de stimuler les défenses de l'hôte en favorisant la maturation, la différenciation et la prolifération des cellules immunitaires, ce qui leur confère plusieurs propriétés thérapeutiques notamment des propriétés anticancérogènes, antibactériennes et antivirales (SANCHEZ, 2006).

À cet effet, différents polysaccharides extraits de champignons, notamment le lentinan, sont utilisés cliniquement dans le traitement de différentes maladies, ainsi que la plupart de ces polysaccharides sont essentiellement des (1-3)- $\beta$  - D-glucane présentant souvent des ramifications simples  $\beta$ -(1-6) (SANCHEZ, 2006).

- **Lentinan**

Le lentinan est un homopolysaccharide avec un poids moléculaire élevé, environ un million, extrait à partir du carpophore de *Lentinus edodes* reconnu pour ses propriétés immunomodulatrices. (ISRAILIDES *et al.*, 2008). Il a une structure de  $\beta$ -(1-3)-D-glucane (SINGDEVSACHAN *et al.*, 2016 ; SANCHEZ, 2006) avec deux ramifications simples  $\beta$ -(1-6)-glucosyl à chaque cinq résidus de la chaîne principale (SANCHEZ, 2006).

Le lentinan se caractérise par son degré de ramification plus élevé de 40% qui est responsable à son activité immunomodulatrice. Il augmente l'activité cytotoxique des macrophages ainsi que l'augmentation de production de cytokines (El ENSHASY et HATTI-KAUL, 2013). Le lentinan a également des effets antibactériens, antifongiques et antiviraux, résultant de son effet immunomodulateur. Par ailleurs, Il est capable de réduire la croissance des tumeurs ainsi que les oncogènes chimiques et virales via la stimulation du système immunitaire, le lentinan est utilisé cliniquement pour lutter contre le cancer. Ce glucane est principalement utilisé comme co-adjuvant en chimiothérapie chez les patients atteints d'un cancer du côlon, du sein, de la prostate, de l'estomac, ou du poumon (SANCHEZ, 2006).

- **Polysaccharides de *Poria cocos***

Le mélange de polysaccharides extrait à partir de *Poria cocos* dont il composé de glucose, l'arabinose, mannose, galactose, et xylose a montré un puissant effet anti-tumoral contre le sarcome180 implanté (type solide) chez la souris (SUN, 2014).

SUN (2014) a également indiqué que l'administration quotidienne de 100 et 200 mg / kg de poids corporel de polysaccharides de *Poria cocos* pendant 7 semaines est efficace pour inhiber complètement la croissance des cellules tumorales.

En outre, le traitement par les polysaccharides de *Poria cocos* induit la production de l'oxyde nitrique (NO) et l'activation de NF- $\kappa$ B « nuclear factor-kappa B » qui peut stimuler la transcription de la Nitrique Oxyde Synthase (iNOS) (SUN, 2014).

La fraction oxydée de polysaccharides de *Poria cocos* qui est composée de sel de sodium de l'acide (1-3)- $\beta$  D-poly-glucuronique hydrosoluble ainsi que les polysaccharides carboxy-méthylés de *Poria cocos* qui sont constitués de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanecarboxy-méthylésont une activité antioxydante (SUN, 2014).

Les mêmes résultats ont été obtenus par WANG *et al.* (2016) sur l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosoluble de *Poria cocos*.

- **Schizophyllan**

Le Schizophyllan est un exopolysaccharide produit par fermentation du champignon de *Schizophyllum commune* (SANCHEZ, 2006). C'est un (1-3)- $\beta$ -glucane ayant un groupement  $\beta$ -glucopyranosyle liées par des liaisons 1-6 à chaque troisième ou quatrième résidu de la chaîne principale (SINGDEVSACHAN *et al.*, 2016).

Le Schizophyllan possède des propriétés immunomodulatrices, qu'il inhibe le sarcome 180 lorsqu'il est injecté par voie intra-péritonéale ou intraveineuse, il active aussi les macrophages *in vitro* et *in vivo*, et il est responsable de l'augmentation des activités des cellules T et la sensibilité des cellules cytotoxiques LAK (lymphokine-activated killers) (SINGDEVSACHAN *et al.*, 2016).

- **Polysaccharides de *Ganoderma lucidum***

Selon WANG *et al.* (2016), les polysaccharides hydrosolubles de *Ganoderma lucidum* constituent de 68,45% de glucose, 15,87% de mannose, 4,71% de xylose, 4,08% d'arabinose, 3,78% de galactose et 3,11 de ribose et ont une activité antidiabétique.

FERREIRA *et al.* (2010) et ZHANG *et al.* (2007) ont montré la présence de l'activité antitumoral chez les polysaccharides de *Ganoderma lucidum* ayant une structure de beta-D-glucane.

En plus de leur activité antidiabétique et antitumorale, les polysaccharides de *Ganoderma lucidum* ont également des propriétés antioxydante et immunomodulatrices dont ils ont la capacité à stimuler la prolifération des macrophages, la production de NO et la phagocytose (SHI *et al.*, 2014).

- **Polysaccharides d'*Armillaria ostoyae***

Les polysaccharides isolés à partir de l'extrait alcalin d'*Armillaria ostoyae* ont présenté une capacité antioxydante plus importante (SIU *et al.*, 2016).

- **Scleroglucane**

Le scleroglucane est un exo-polysaccharide sécrété par certains champignons du genre *Sclerotium*. Ce polysaccharide est un  $\beta$ -(1-3) glucane avec des ramifications simples  $\beta$ -(1-6) à chaque trois résidu glucosyl. Malgré ses caractéristiques fonctionnelles (viscosité intrinsèque, stabilité thermique, capacité de gélification), le scleroglucane présente des propriétés antitumorales (SANCHEZ, 2006).

- **Polysaccharide acide de *Pleurotus ostreatus***

Des études menées par VAMANU (2012) sur la mesure de l'activité antioxydante des exopolysaccharides et les polysaccharides internes obtenus à partir *Pleurotus ostreatus* par différents test, DPPH (2,2-diphényl-1-picéylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthyl-benzothiazoline-6-sulphonique acid)) ont révélé l'existence d'une activité antioxydante puissante.

- **Le krestin**

Le krestin est un protéoglycane isolé à partir de *Coriolus versicolor*, compte avec le lentinan, parmi les plus importants polysaccharides utilisés cliniquement (SANCHEZ, 2006). Il est constitué de glucose, galactose, mannose, xylose, et arabinose (CUI et CHISTI, 2003), et montré une forte activité anticancérogène (CUI et CHISTI, 2003 ; SANCHEZ, 2006) dont il est très utilisé cliniquement pour combattre le cancer de l'estomac, de l'œsophage, du colon, du rectum et du poumon (SANCHEZ, 2006).

Le krestin est caractérisé aussi par son effet immunomodulateur due à son capacité d'augmenter la transcription du gène du facteur de nécrose tumorale (TNF) dans les macrophages péritonéaux de souris (CUI et CHISTI, 2003).

# *Chapitre II.-*

---

## *Matériel et méthodes*



## II.1.- Principe d'étude

La présente étude est une contribution à valoriser les truffes du désert récoltées dans la région de la Sahara septentrional Algérien. L'étude porte sur l'analyse biochimique de *Terfezia arenaria*, suivie d'une extraction des polysaccharides hydrosoluble et leur caractérisation. De même, ce travail a pour objectif de tester les potentiels biologiques, des polysaccharides isolés à partir de *Terfezia arenaria*, dont les activités antioxydantes, antidiabétique et phagocytaires.

## II.2.- Matériel d'étude

Le matériel d'étude regroupe le matériel biologique, les produits et l'appareillage.

### II.2.1.- Matériel biologique

#### II.2.1.1.- Le choix de l'espèce

Le matériel biologique représente un champignon symbiote, mycorhizien, comestible, hypogé avec des plantes de la famille des Cistaceae et plus particulièrement avec l'*Helianthemum lippii*, utilisé traditionnellement par la population de la région de Sahara septentrional algérien pour ces propriétés alimentaires et médicinales. Il s'agit de *Terfezia arenaria* (photo 01) qui est parmi les différentes truffes comestibles connues dans l'Algérie (BRADAI *et al.*, 2015).

Elle est connue localement sous le nom de « Terfesse Lahmar » (BRADAI *et al.*, 2014), elle a une distribution géographique spécifique qui se limite en particulier aux conditions climatiques et pédologiques (WANG et MARCONE, 2011).



Photo 1.- *Terfezia arenaria* (Terfeziaceae)

### II.2.2.2.- Position systématique (TRAPPE *et al.*, 1979)

- ❖ Règne : Fungi.
- ❖ Embranchement : Septomycota.
- ❖ Sous embranchement : Ascomycotina.
- ❖ Classe : Euascomycetes (Eutuniquées).
- ❖ Sous classe : Discomycetidae.
- ❖ Ordre: Tubérales.
- ❖ Famille: Terfeziaceae.
- ❖ Genre: *Terfezia*.
- ❖ Espèce: *Terfezia arenaria*.

### II.2.2.3.-Répartition géographique

Généralement, *T. arenaria* est une espèce très commune dans les pays d'Afrique du Nord (KHABAR, 2014). En Algérie, cette espèce a été signalée à Bou-Saâda et dans la région de Zeriguet à Béchar par FORTAS et CHEVALIER. (1992).

*T. arenaria* constitue le Terfez du bassin méditerranéen occidental. Il a la plus large répartition géographique en Europe (Hongrie, Portugal, Espagne, Italie, Grèce, Roumanie) et en Afrique du Nord (CHEVALIER, 2014) et l'Asie Mineure et le Moyen-Orient (LOIZIDE *et al.*, 2011).

### II.2.1.2.- Récolte, séchage et broyage de *Terfezia arenaria*

Le choix des sites de collecte et de prélèvement des truffes est basé sur les orientations et les indications des autochtones du Sahara, les nomades et aussi les chercheurs de la truffe du désert. Ces stations sont connues comme étant des zones productrices habituelles de truffes (BRADAI *et al.*, 2013).

Les échantillons frais de truffes sont récoltés du Sahara Algérien, puis identifiés par Dr Bradai Iyes. Les truffes récoltés sont coupés à l'aide d'une lame tranchante, pulvérisés par éthanol puis déposés sur papier kraft à l'abri de la lumière, de la chaleur, sous ventilation à l'air libre et à température ambiante jusqu'à l'obtention d'un poids sec (VELASCO-LEZAMA *et al.*, 2006 ; HEDJAL-CHEBHEB, 2014). Les échantillons ainsi séchés sont conservés à température ambiante (15 à 20°C) dans des boîtes dans un milieu sec à l'abri de la lumière

jusqu'à leur utilisation (DIALLO *et al.*, 2004). Ensuite, l'échantillon séché est broyée pendant 1 min par un broyeur WARING, Torrington CT06790, Modèle WSG90E, puis séché à l'étuve à 50°C pendant une nuit.

### **II.2.2.- Produits et appareillage utilisés**

L'ensemble des produits chimiques, solvants et réactifs utilisés dans le cadre de ce travail sont stockés à l'abri de la lumière et en atmosphère inerte. L'origine et la pureté des réactifs et des solvants utilisés au cours de ce travail sont décrits dans le tableau 01. L'origine et le type d'appareils sont présentés dans le tableau 02.

Tableau 1.- Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation

Produit	Fournisseur	Caractéristiques				
		Forme	Formule chimique	M. molaire g/mol	Densité g/cm <sup>3</sup>	Pureté %
ABTS	SIGMA	Poudre	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub>	548	/	98
Acétate d'éthyle	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	/	/
Acétate de sodium	VWR PROLABO	Poudre	CH <sub>3</sub> COONa	82,03	/	/
Acétone	GPR RECTAPUR	Liquide	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58,08	0.792	100
Acide acétique	EDEN-LABO	Liquide	CH <sub>3</sub> COOH	60,05	1.048-1.051	99.5
Acide chlorhydrique	SIGMA-ALDRICH	Liquide	HCl	36.46	1.19	37
Acide orthophosphorique	SIGMA-ALDRICH	Liquide	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	98	1,69	85-88
Acide trifluoroacétique	SIGMA-ALDRICH	Liquide	CF <sub>3</sub> COOH	114,02	1,49	99.8
Aniline	RECTAPUR	Liquide	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	93.13g	1.02-1.03	98.5
Acétonitrile	SCHARLAU	Liquide	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	41,05	99,9	99
Butanol	SIGMA ALDRICH	Liquide	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	74.12	81	99.9
Bicarbonate de sodium	BIOCHEM	Poudre	Na <sub>2</sub> CHO <sub>3</sub>	84,01	/	99,5
Carbonate de sodium anhydre	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,99	/	99,9
Chloroforme	SCHARLAU	Liquide	CHCl <sub>3</sub>	119.38	1.47	99-99.6
Chlorure de calcium	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	CaCl <sub>2</sub>	110.98	2.15	99.9
Chlorure de magnésium	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	MgCl <sub>2</sub>	95.21	2.32	98
Chlorure de potassium	EDEN LABO	Poudre	KCl	74.55	1.98	99
Chlorure de sodium	SIGMA ALDRICH	Poudre	NaCl	58.44	2.16	99.5
Diphénylamine	RIEDL-DE HEAN AG	Solide	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N	169.23	52.5-54.5	98
DPPH	ALDRICH	Poudre	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	394	/	/
Ethanol	SIGMA-ALDRICH	Liquide	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	0,803-0,805	99,5
Ether de pétrole	SIGMA-ALDRICH	Liquide	/	/	/	95
Chlorure de fer ferrique hexahydraté	VWR PROLABO	Poudre	Cl <sub>3</sub> Fe.6H <sub>2</sub> O	270,30	/	/
Hydroxyde de sodium	EDEN LABO	Poudre	NaOH	39.997	2.13	99
Isopropanol	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	60,10	0,803-0,805	99,5
Méthanol	SCHARLAU	Poudre	CH <sub>3</sub> OH	32.04	0.79	99.9

HIS	TOSOH EUROPE N.V	Liquide	/	/	/	/
Sulfate de cuivre (II) penta hydraté	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	CuSo <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	249,68	/	/
Persulfate de potassium	BIOCHEM	Poudre	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	270,31	/	/
Phénol	FLUKA CHEMIK	liquide	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	94,11	/	90
Phosphate de potassium dibasique	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	2.338	99
Phosphate di-sodique di-hydraté	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	Na <sub>2</sub> HPo <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> o	177.99	1.63	99.5
Pyridine	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	79,10	/	99,5
Rouge phénol	BIOCHEM	Poudre	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> S	354,38	/	98-100
Sérum Albumine Bovine (BSA)	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	/	/	/	96
Tartrate de sodium et de potassium tétrahydraté	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	282,22	/	98
TPTZ	SIGMA-ALDRICH	Poudre	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub>	312,33	/	99
Trolox	ALDRICH	Poudre	/	250,29	/	97

Tableau 2.- Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation

Appareil	Fournisseur	Type	Lieu de fabrication
Agitateur magnétique Applicateur	VELP CSIENTIFICA MELENA LABORATOIRES	F20520162 SUPER Z, N° série 4084	EUROPE USA
Autoclave Bain marie	Pb INTERNATIONAL MEMMERT	0178107 3707G3, N° série 028717 MEMMERTGMBH. WB 7. NENNTMP ; 100 °C	USA GERMANY
Incubateur	TEGIMENTA	CORAS EIA, N° série 27- 4135	SWISS
Microscope numérique	MICROS	MC 50 LED, N° série 2401986	AUSTRALIE
Balance	OHAUS	DISCOVERY DV 215CD OHAUS.	USA.
Centrifugeuse	SIGMA	SIGMA. 15PK, 14000 RPM.	
Four à moufle	PROTHERM	FURNANCES, électrique max. 1 200 °C	ALLMANGE
Etuve	MELAG	MELAG815.220V, 50 HZ, 12.3A, 2700 w.	TURQUIE
Hotte	TEL STAR	TELSTAR AV-100. MODELE50/60 HZ, 0.6 KW.	GERMANY SPAIN
Lyophilisateur	CHRIST	CHRIST.ALPHA 1-2LD. 101021.230V, 50HZ, 0.7. KW.	GERMANY
Macropipette	SOCOREX	ACURA 835 de 0,5-5 ml, N° série 24011259	SWIS
Micropipette	SOCOREX	ACURA 821. 200-1000 ML	SWIS
Mixeur	BIG BOSS Electronics	R11	CHINA
PH mètre	WTW	INOLAB pH 720, N° série 08090760	GERMANY
Spectrophotomètre	SHIMADZU	UVmini-1240, N° série A109345	JAPAN
Flamme photomètre	SHERWOOD	SHERWOOD.SCIENTIFIC LID, série N°18349	UK

### II.3.- Analyses physico-chimiques et biochimiques de *Terfezia arenaria*

Les analyses portent sur des réactions de coloration, le taux des oses simples, les lipides, les acides gras à court chaîne, les polyphénols totaux, les flavonoïdes, ainsi que sur la détermination de la teneur en cendres et les éléments minéraux. Les analyses sont répétées trois fois supplémentaires.

#### II.3.1.-Dosage des cendres

La teneur en cendres est déterminée selon la méthode d'AOAC (2000). Le principe de la méthode est basé sur la calcination de l'échantillon dans un four à moufle jusqu'à obtention de cendres blanchâtres de poids constant (TRACHI, 2015).

Deux grammes de l'échantillon broyé sont placés dans une capsule en porcelaine qui est mise par la suite dans l'étuve à  $103\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 24h. La matière séchée est ensuite placée dans un four réglé à  $550^{\circ}\text{C}$  pendant 8 heures jusqu'à l'obtention d'une couleur grise-claire ou blanchâtre. Par la suite, la capsule est retirée du four, refroidie dans un dessiccateur puis pesée (PALAZZOLO *et al.*, 2012). La teneur en cendres est déterminée par la formule suivante (AUDIGIE, 1983) :

Où :

$$X = (W_2 - W_0 / W_1) \times 100$$

- $W_0$  : Poids de creuset vide (g).
- $W_1$  : Poids de l'échantillon avant incinération (g).
- $W_2$  : Poids (creuset + cendres) après incinération (g).

### **II.3.2.- Dosage des sels minéraux**

La quantification des éléments minéraux a été effectuée selon la méthode normalisée NF V 05-113, 1972 (AFNOR, 1982).

La photométrie à flamme repose sur le fait que tout atome situé à un niveau énergétique dit excité émet des radiations caractéristiques en retournant à l'état fondamental. L'excitation des atomes se fait au moyen de la chaleur. La mesure est réalisée sur une raie choisie où l'intensité est proportionnelle à sa concentration (MEDJDOUB, 2013).

Pour doser les sels minéraux tels que le Potassium et le Sodium, les cendres ont dissous dans un 10ml d'acide chlorhydrique à 0,5N et complétée jusqu' à 20ml par l'eau bi-distillée (BANGOOD, 1984). Le dosage s'effectue par spectrométrie d'absorption à flamme (PERE, 1999).

### **II.3.3.- Détermination de l'Acidité titrable**

L'acidité titrable est déterminée selon la méthode NF V 05-101 (1974) décrite par AFNOR (1982). Le principe de cette méthode se base sur le titrage de l'acidité d'une solution aqueuse avec une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphthaléine comme indicateur.

Un gramme de l'échantillon est placé dans une fiole conique avec 10ml d'eau distillée chaude récemment bouillie et refroidie. La fiole conique est adaptée à un réfrigérant à reflux afin de chauffer le contenu au bain-marie pendant 30min. Après refroidissement, le contenu de la fiole conique est transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 250ml et complété jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée chaude récemment bouillie et refroidie. Ensuite, le mélange est centrifugé à 4000g pendant 5min. Par la suite, 50ml du filtrat, versés dans un bêcher, sont titrés avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1N, en présence de 2 à 3 gouttes



de phénolphtaléine, jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante pendant 30 secondes (IGUERGAZIZ, 2012 ; SANTHARAM *et al.*, 2013)

L'acidité titrable, exprimée en milléquivalents de NaOH par 100g de matière, est déterminée selon la formule suivante :

$$A (\%) = (250.V_1.100) / (M.10.V_0)$$

Où:

- M : masse en (g) de poudre prélevée.
- V<sub>0</sub> : volume en ml de la prise d'essai (50ml).
- V<sub>1</sub> : volume en ml de la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1N utilisé.

#### II.3.4.- Dosage des lipides

La quantité de lipides est obtenue par extraction au Soxhlet, selon la méthode décrite par AFNOR (1982). Le principe de la méthode est basé sur l'extraction solide liquide de l'échantillon au moyen de l'appareil de Soxhlet, en utilisant l'éther de pétrole comme phase liquide (HAMZA *et al.*, 2013).

Afin d'extraire et de déterminer la teneur en matières grasses de l'échantillon, deux grammes de *T. arenaria* broyé sont introduits dans la cartouche du Soxhlet et placés à l'intérieur de l'extracteur. Une quantité de 200ml d'éther du pétrole sont versés dans le ballon. Ce dernier est ensuite chauffé pendant 3h jusqu'à épuisement de la matière grasse. Le résidu du ballon est séché dans une étuve à 103±2°C. Après refroidissement au dessiccateur pendant 30min, le ballon contenant les lipides est pesé à 0,001g près jusqu'à obtention d'un poids constant (HAMZA *et al.*, 2013 ; TRACHI, 2015).

La teneur en lipides (MG) est obtenue par la formule suivante :

$$\text{MG (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

Où:

- MG %: pourcentage de la matière grasse.
- P<sub>1</sub> : poids du creuset vide (g).
- P<sub>2</sub> : poids du creuset avec l'huile extraite (g).
- P<sub>3</sub> : masse de la prise d'essai (g).

### II.3.5.- Dosage des protéines par la méthode de BRADFORD

Dans un milieu acide, le réactif de Coomassie se lie aux protéines provoquant la formation d'un complexe de coloration bleue qui absorbe entre 465 et 595nm. L'intensité de la coloration est quantifiable et permet de déterminer indirectement et de manière proportionnelle la quantité de protéines présentes. La concentration en protéines est obtenue par référence avec une gamme étalon de sérum albumine bovine, après coloration au bleu de Coomassie (WARRAND, 2004 ; PIERRE, 2010).

#### II.3.5.1.- Préparation du bleu de Coomassie d'après BRADFORD (1976)

25mg de bleu de Coomassie est dissous dans 12,5ml d'éthanol (95%) puis 25ml d'acide phosphorique (85%) est ajouté. Ensuite en diluant la solution obtenue à un volume final de 250ml.

L'estimation de la quantité des protéines dans l'extrait aqueux de *T. arenaria* est réalisée selon la méthode de dosage de Bradford (Bradford, 1976). 200µl de l'échantillon est introduite dans un tube à essai puis 2ml de bleu de Coomassie est ajoutée. Après avoir mélangé, ces tubes sont incubés au bain Marie à 37°C pendant 30min. la densité optique est lit par un spectrophotomètre à 595nm et une gamme des standards de 0,001 jusqu'à 0,005% est préparé en diluant une solution mère de BSA de 0,01% (annexe 01).

### II.3.6.- Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été déterminé par une méthode adaptée de SINGLETON et ROSS. (1965) avec le réactif de Folin Ciocalteu (GINER-CHAVEZ, 1996). En milieu basique, le réactif de Folin Ciocalteu qui est formé d'acide phosphotungstique  $H_3PW_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $H_3PMo_{12}O_{40}$  oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'échantillon. Les produits de réduction de couleur bleue présentent un maximum d'absorption dont l'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés. La mesure de l'absorbance est effectuée à 765nm par un spectrophotomètre et une courbe d'étalonnage est effectuée en prenant l'acide gallique comme référence (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006). Les résultats obtenus, sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (MUANDA, 2010).

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique de *T. arenaria* est déterminée selon une méthode adaptée par SINGLETON et ROSS (1965). A l'aide d'une micropipette, 100µl de *T. arenaria* sont introduits dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 500µl du réactif de Folin-Ciocalteu qui est dilué dix fois. Après incubation pendant 2min, 2ml de carbonates de sodium à 20% sont ajoutées. Après avoir mélangé, ces tubes sont maintenus à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 760nm par un spectrophotomètre. Une gamme des standards de 0,005 à 0,035% est préparée en diluant une solution mère de l'acide gallique de 0,1% (annexe 02).

### II.3.7.- Dosage des flavonoïdes

La détermination de la concentration en flavonoïdes totaux est effectuée en utilisant la méthode du trichlorure d'aluminium (LAMAISON et CARNET, 1990). Le principe de la méthode est basé sur le fait que les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner, avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux

atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (TRACHI, 2015).

### II.3.7.2.- Préparation de l'extrait de *T. arenaria*

La préparation de l'extrait de *T. arenaria* a été effectuée selon le protocole décrit par ATTOU. (2011) avec quelques modifications mineures, en utilisant le méthanol comme solvant (BARREIRA *et al.*, 2008). Deux grammes de poudre de *T. arenaria* est macéré dans 20ml de méthanol absolue, pendant une nuit à température ambiante, l'extrait est ensuite centrifugé à 5000tr/min pendant 10mn. Le surnageant, ou l'extrait méthanolique a été récupéré et conservé à froid (+4°C) jusqu'à son utilisation (BENHAMMOU *et al.*, 2009).

La teneur en flavonoïdes est déterminée en utilisant la méthode de trichlorure d'aluminium (BAHROUN *et al.*, 1996 ; DJERIDANE *et al.*, 2006). À 1ml d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté 1ml de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol). Le mélange est agité, et l'absorbance est lue à 430nm après l'incubation de 10min à température ambiante. La concentration en flavonoïdes, est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la rutine (0-35µg/ml), et est exprimée en milligramme d'équivalent de rutine par gramme d'extrait sec (annexe 03).

### II.3.8.- Dosage des sucres réducteurs à l'acide bicinchoninique

Le dosage des sucres réducteurs a été effectué par une méthode adaptée de WAFFENSCHMIDT et JAENICKE (1987) avec l'acide bicinchoninique. Ce test colorimétrique est basé sur la réduction du cuivre. Le couple L-sérine/Cu<sup>2+</sup> en présence d'une extrémité réductrice est réduit en L-sérine/Cu<sup>+</sup>. La détection des ions Cu<sup>+</sup> est réalisée à l'aide de l'acide bicinchoninique (4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline) qui forme un complexe coloré avec le couple L-sérine/Cu<sup>+</sup>. L'apparition de ces complexes est suivie en mesurant l'absorbance à 540nm (NADOUR, 2015).

**II.3.8.2.- Préparation des réactifs (WAFFENSCHMIDT et JAENICKE, 1987)**

Deux solutions sont préparées pour le dosage.

- Solution A : 0,484g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,27g de NaHCO<sub>3</sub> et 38,84mg de 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline sont dissous dans 20ml d'eau distillée.
- Solution B : 25,24mg de L-sérine et 24,96mg de CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O sont dissous dans 20ml d'eau distillée.

**II.3.8.3.- Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose**

**Tableau 3.- Préparation des étalons de glucose (NADOUR, 2015).**

Con (g/l)	Blanc	0,005	0,01	0,015	0,020	0,025	0,030	0,035	0,040
GLC 0,1g/l (μl)	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Eau distillée (μl)	200	190	180	170	160	150	140	130	120

La méthode de WAFFENSCHMIDT et JAENICKE (1987) est utilisée pour doser les sucres réducteurs dans l'extrait éthanolique de *T. arenaria*. A l'aide d'une micropipette, 200μl d'échantillon sont mélangés avec 800μl d'eau distillée et 500μl de réactif A+B (v/v). Le mélange réactionnel est incubé à 100°C pendant 15min puis refroidi pendant 10min dans un bain d'eau à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 540nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec des solutions de glucose de concentrations comprises entre 5 et 40mg/l (annexe 04).

**II.4.-Etude des polysaccharides de *Terfezia arenaria*****II.4.1.- Extraction des polysaccharides hydro et alcalisolubles de *Terfezia arenaria* (Protocole modifié)**

Une quantité de 10 grammes de broyât (XU *et al.*, 2016) est prétraitée par 100ml d'éthanol à 96% (BOUAL *et al.*, 2013a) , en mettant à reflux pendant 3h sous agitation et à

95°C (WANG *et al.*, 2016), afin d'éliminer les composants interférents comme les polyphénols, les oligosaccharides, les oses simples (XIE *et al.*, 2010), les pigments, les composés de faible poids moléculaire (TOGOLA *et al.*, 2008a) ainsi que les composés lipophiles (TOGOLA *et al.*, 2008b). Après la centrifugation à 10000g pendant 15min à température ambiante (AFSHARI *et al.*, 2015), le surnageant est récupéré, puis concentré au rotavapor jusqu'à l'évaporation totale (BOUAL *et al.*, 2015 ; CAI *et al.*, 2016 ). L'extrait est repris dans 10ml d'eau distillée, puis congelé à -20°C pour lyophilisation (CAI *et al.*, 2016). Tandis que, le culot est séché à l'étuve à 50°C (WU *et al.*, 2016) et macéré dans 70ml de la solution alcaline de NaOH 0,5M (BALLESTEROS *et al.*, 2015 ; SIU *et al.*, 2016) et chauffé à 80°C pendant 2h et sous agitation à pale (250rpm). Le mélange est centrifugé à 10000g pendant 20min à la température ambiante (BALLESTEROS *et al.*, 2015). Le surnageant de 66ml est passé à la filtration par 2 filtres Sortorius de 5,0µm et 10 filtres Sortorius de 0,45µm, ce qui a donné un volume de 55ml (WU *et al.*, 2013). L'extrait alcalin est neutralisé par quelques gouttes d'HCl à 10M (SIU *et al.*, 2016). Aucun précipité n'a été remarqué.

Ensuite, Trois volume d'éthanol 96% froide (-20°C) sont ajoutés à l'extrait (DENG *et al.*, 2013), dont il est remarqué un précipité. La solution est laissé 24h à -20°C (BOUAL *et al.*, 2013a ; SIU *et al.*, 2016 ; WANG *et al.*, 2016 ). Après centrifugation à 10000 g/15 min à la température ambiante (WU *et al.*, 2016 ; WANG *et al.*, 2016), un précipité est bien remarqué.

Le culot est récupéré et mis en solution par l'ajout de 50ml d'eau distillée (WANG *et al.*, 2016), chauffé à 37°C et agité jusqu'à la dissolution totale (XIONG *et al.*, 2015). Deux gramme de l'*acide trichloroacétique* (TCA) équivalent de 4% est ajouté à la solution afin de précipiter les protéines, dont il est remarqué l'apparition d'un trouble blanc. La solution est mis dans un bain de glace pendant 10min, puis centrifugée à 10000g pendant 20min à la température ambiante (LUO *et al.*, 2011). Trois volume d'éthanol sont ajoutés au surnageant (XIONG *et al.*, 2015), dont il est remarqué l'apparition d'un précipité blanchâtre. La solution est conservée à -20°C pendant 24h (YAN *et al.*, 2015), puis centrifugée à 10000g/15min à la température ambiante. Le culot est lavé 3 fois par l'acétone (mise en solution par l'acétone froid, refroidissement dans un bain de glace pendant 10min puis centrifugation à 10000g/20 min à 4°C) (BALLESTEROS *et al.*, 2015). Le culot est séché à l'étuve à 50°C pendant 24 h (YAN *et al.*, 2011).

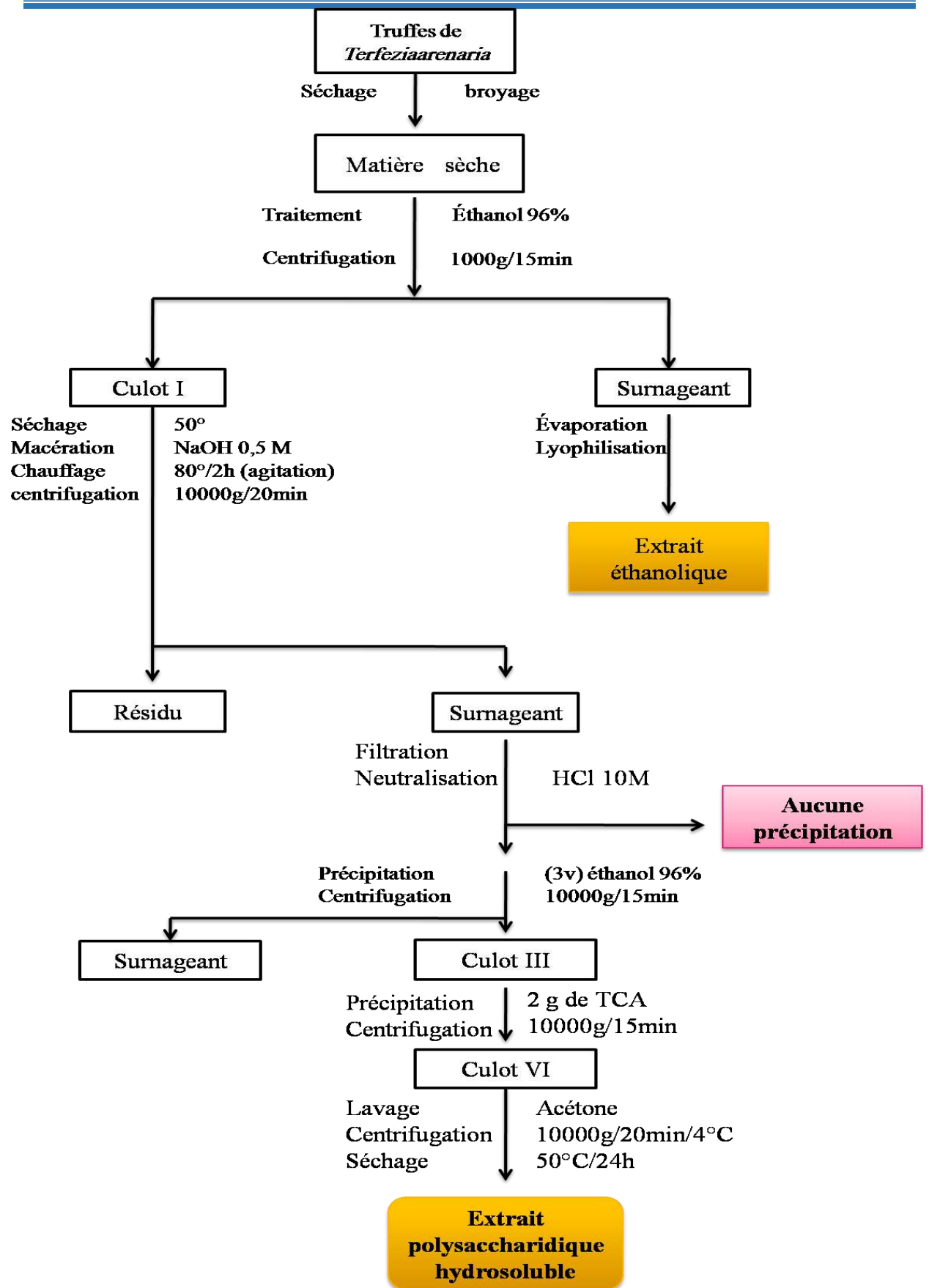


Figure 1.- Différentes étapes de l'extraction des polysaccharides hydro et alcalisolubles de *Terfezia arenaria*

### II.4.2.1.- Dosage des oses totaux

La composition en oses totaux de l'extrait brut de polysaccharides de *T. arenaria* a été déterminée via l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Dubois *et al.* (1956). Dans un milieu acide concentré et chaud, les pentoses et les hexoses se déshydratent et se transforment respectivement en dérivés du furfural et 5-hydroxyméthylfurfural qui, en se complexant avec le phénol, donnent des composés de couleur jaune-orangée. Ces complexes permettent de suivre la concentration en oses totaux de l'échantillon en lisant l'absorbance à 490nm (PIERRE, 2010).

#### II.4.2.1.1.- Préparation du phénol

Afin de préparer une solution de phénols à 5%, 1g de phénol est dissous dans 20ml d'eau distillée (DUBOIS *et al.*, 1956).

#### II.4.2.1.2.- Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, introduire 200µl de la solution à doser de concentration de 0,01% puis 200µl d'une solution de phénol à 5% est ajoutée. Le mélange est ensuite homogénéisé par le vortex, et 1ml d'acide sulfurique 95-98% est rapidement introduit avec précaution dans le milieu réactionnel. Les tubes sont ensuite placés dans un bain de glace puis placés à l'obscurité pendant 30min. La densité optique est mesurée par un spectrophotomètre UV-visible à 490nm et une gamme des standards de 0,001 jusqu'à 0,01% est préparée en diluant une solution mère de glucose de 0,01% (annexe 05) (RUIZ, 2005).

### II.4.2.2.- Dosage des oses neutres

En milieu acide concentré, les glucides se transforment en dérivés furfuraux qui, en se complexant avec le phénol, donnent des composés de couleur orangée (Dubois, 1956). Cette méthode de dosage adaptée aux microplaques (Monsigny, 1988) est utilisée pour quantifier les oses neutres dans les fractions collectées.



#### II.4.2.2.1.- Préparation du résorcinol

Afin de préparer une solution de résorcinol à 0,6%, on a dissous 0,3g dans 50ml d'eau distillée (WARRANT, 2004).

#### II.4.2.2.2.- Mode opératoire

200µl d'échantillon à analyser sont ajoutés à 200µl de résorcinol à 0,6%. Ensuite 1ml d'acide sulfurique concentré est introduit. Le mélange est porté au bain Marie à 90°C pendant 30min puis l'échantillon est placé dans un bain de glace et à l'obscurité durant 30min. L'absorbance est mesurée à 480nm et la concentration en oses neutres est obtenue par référence à une gamme étalon de glucose de 0,001 à 0,01% (annexe 06).

#### II.4.2.3.- Dosage des oses acides

La teneur en acide uronique est déterminée selon la méthode de BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1973). Le dosage repose sur la formation d'un complexe chromophore de couleur rose qui est dosé par spectroscopie d'absorption UV. Les solutions développent une coloration rose lue à 520 nm.

Sous l'action d'acides minéraux concentrés à chaud, les acides uroniques du milieu subissent une déshydratation interne poussée suivie d'une cyclisation aboutissant à la formation de dérivés d'acide 5-formylfuroïque. Les acides uroniques réagissent alors avec le méta-hydroxydiphényle (MHDP) pour former un chromophore de couleur rose absorbant à  $\lambda=520\text{nm}$ . La coloration est améliorée par la présence de borate (PIERRE, 2010).

#### II.4.2.3.1.- Préparation des réactifs

➤ Solution A

Une quantité de 0,95g de Borax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) est dissous dans 2ml d' $\text{H}_2\text{O}$ , dans une fiole de 100ml complétée ensuite au trait de jauge avec de l'acide sulfurique concentré. Cette solution est conservée à 4°C (BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN, 1973).

➤ Solution B

Dans une fiole de 100ml, 150mg de m-HDP et 500mg de NaOH sont introduits puis le volume est complété au trait de jauge avec de l'eau distillée (DELATTRE, 2005).

#### **II.4.2.3.2.-Mode opératoire**

La méthode colorimétrique employée est celle de BLUMENKRANTZ et ASBOE HANSEN (1973) et BRUDIEUX (2007). Dans des tubes à essai, 200µl de la solution à doser est ajoutée à 1,2ml d'une solution de tétraborate de sodium à 0,0125M dans l'acide sulfurique concentré puis on les agite. Ensuite les tubes sont placés dans un bain Marie à 100°C pendant 5min. après refroidissement environ 10min dans un bain de glace, 20µl d'm-HDP est introduit. Les tubes sont agités et une coloration rose se développe après 5min. l'absorbance est mesurée à 520nm et la concentration en oses acides est obtenue par référence à une gamme étalon d'acide glucuronique de 0,001 à 0,01% (annexe 07).

#### **II.4.2.4.- Dosage des protéines par la méthode de LOWRY et BRADFORD**

Le dosage des protéines s'effectue par deux méthodes à des sensibilités différentes, la réaction de BRADFORD et celle de LOWRY, et ceci pour confirmer les résultats.

##### **II.4.2.4.1.- Dosage des protéines par la méthode de LOWRY**

La technique de LOWRY est une méthode dérivée du biuret, dans laquelle la solution protéique traitée par du  $\text{CuSO}_4$  dilué en milieu alcalin, réduit les ions cuivriques  $\text{Cu}^{++}$  en ions cuivreux  $\text{Cu}^+$ . Dans cette méthode, un réactif phosphotungstomolybdique (dit de Folin-Ciocalteu) est ajouté au réactif cuivrique alcalin précédent qui réagit avec les résidus tyrosine des polypeptides pour former des complexes absorbant entre 650 et 750nm (HAINQUE *et al.*, 2008).

##### **II.4.2.4.1.2.- Préparation des réactifs d'après LOWRY *et al* (1951)**

- Réactif A : 1g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  est dissous dans 50ml d'eau distillée puis 50ml d'une solution NaOH de 0,1N est ajoutée.
- Réactif B : une solution de 0,5% de  $\text{CuSO}_4$  a mélangé avec une solution de tartrate de sodium à 1%.

- Réactif C : c'est une solution alcaline de cuivre, 1ml du réactif B a mélangé avec 50ml du réactif A.

#### **II.4.2.4.1.3.-Mode d'opérateur**

La quantité de protéines présentes dans l'extrait polysaccharidiques de *T. arenaria* est déterminée via l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par LOWRY *et al.* (1951). Dans des tubes à essai en verre, 400µl d'échantillon est ajouté, puis 2ml de la solution de LOWRY et 200µl du réactif Folin-Ciocalteu sont pipetés. Après agitation pendant 10min, le mélange est ensuite laissé à l'obscurité à température ambiante pendant 30min. La densité optique du mélange est lue à 750nm dans un spectrophotomètre UV-Vis. La concentration en protéines est obtenue par référence à une gamme étalon de BSA de 0,01 à 0,1% (annexe 08) (WARRAND, 2004).

#### **II.4.2.4.2.- Dosage des protéines par la méthode de BRADFORD**

##### **II.4.2.4.2.1.- Mode d'opérateur**

L'estimation de la quantité des protéines de notre échantillon est réalisée selon la méthode de dosage de Bradford (Bradford, 1976). 200µl de l'échantillon est introduite dans un tube à essai puis 2ml de bleu de Coomassie est ajoutée. Après avoir mélangé, ces tubes sont incubés au bain Marie à 37°C pendant 30min. la densité optique est lue par un spectrophotomètre à 595nm et une gamme des standards de 0,001 jusqu'à 0,01% est préparée en diluant une solution mère de BSA de 0,01% (annexe 01).

#### **II.4.3.- Caractérisation des résidus glycosidiques**

Les polysaccharides peuvent être composés par différents monosaccharides. L'analyse de ces dernières nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques et les monosaccharides libérés sont identifiés par chromatographie sur couche mince (RUIZ, 2005 ; RUTHES *et al.*, 2015).

### II.4.3.1.- Hydrolyse des liaisons glycosidiques dans des conditions acides

Le principe consiste à hydrolyser l'échantillon à analyser par un acide. La dépolymérisation peut être conduite avec des acides de forces et de concentrations variables sous diverses conditions opératoires (température, temps de réaction) selon la nature et la structure du polysaccharide (BARBAT, 2009). Parmi les acides employés à chaud pour l'étude, il y'a l'acide sulfurique, l'acide trifluoroacétique, et ainsi l'acide chlorhydrique. L'acide de choix pour la plupart des analyses de glucides est l'acide trifluoroacétique en raison de leur efficacité à hydrolyser les liaisons glycosidiques sans causant la destruction des monosaccharides résultants (WANG *et al.*, 2004).

Pour ce qui concerne l'hydrolyse chimique, on ne peut pas parler de spécificité au sens propre du terme. Le clivage de la liaison osidique, en présence d'acide minéral ou organique et à chaud, dépend essentiellement de la stabilité du lien covalent dans les conditions opératoires imposées. (GENESTIE, 2006).

#### II.4.3.1.2.- Mode d'opérateur

Dans un flacon à vis de petit volume, 1ml de TFA de 2M est ajouté à 25mg de polysaccharides lyophilisés, puis on le laisse dans l'étuve à 110°C pendant 4h (NIU *et al.*, 2011 ; CAI *et al.*, 2016). Ensuite, le flacon est refroidi au bain de glace et le surnageant est récupéré sur des verres de montre après une centrifugation à 4000g pendant 15min. Par la suite quelques gouttes de méthanol sont additionnées et les verres de montre sont déposés dans un dessiccateur sous vide pendant 24h. Après évaporation et séchage total de l'hydrolysate, 1ml de l'eau distillée est ajoutée pour solubiliser les oses. Ensuite, l'hydrolysate est récupéré dans des eppendorfs (AI *et al.*, 2012 ; YAN *et al.*, 2015).

#### II.4.3.2.- Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a été utilisée pour suivre le degré de dépolymérisation des différents échantillons saccharidiques (PIERRE, 2010). C'est une méthode repose principalement sur des phénomènes d'adsorption (DELATTRE, 2005). Elle utilise la phase stationnaire fixée sur des supports rigides maintenus verticaux dans une cuve à chromatographie. La phase mobile est un solvant organique ou un mélange de solvants, qui est déposé au fond de la cuve à la base de la plaque de chromatographie. Cette phase mobile montre le long de la plaque par capillarité. Lorsque le développement est achevé, on sort le

chromatogramme, on le sèche et on le révèle, c'est-à-dire que l'on fait apparaître par un procédé approprié, sous forme de taches, les diverses molécules qui ont été séparées (HAINQUE *et al.*, 2008).

Le support peut être une cellulose ou gel de silice et, de ce fait, les applications de CCM sont plus vastes (HAINQUE *et al.*, 2008).

#### **II.4.3.2.1.- Mode opératoire**

Le choix du système est en fonction de la nature des oses à séparer et les rapports frontaux obtenus. Dans la présente étude, l'extrait méthanolique et polysaccharidique de *T. arenaria* sont analysés en utilisant des plaques commerciales prêtes à être utilisées, de gel de silice (SKALSKA-KAMIŃSKA *et al.*, 2009). Le Nigrum est utilisé comme révélateur pour les oses simples (CHEBREGZABEIER *et al.*, 1976).

#### **II.4.3.2.2.- Préparation la phase mobile**

Plusieurs phases mobiles ont été essayées :

- Système I est constituée d'acétate d'éthyle, pyridine, eau, n-butanol, acide acétique dont les proportions sont : 5-4-4-10-2 (HOTON-DORGE, 1976).
- Système II est constituée de chloroforme, n-butanol, méthanol, acide acétique, eau avec les proportions suivantes : 4,5-12,5-5-1,5-1,5 (CHENG *et al.*, 2010).
- Système III est constituée d'acétate d'éthyle, acide acétique, eau dont les proportions sont : 12-6-4 (Y *et al.*, 1966).
- Système IV est constituée d'acétonitrile, acétate d'éthyle, propanol, eau avec les proportions suivantes : 8,5-2-2-1,5 (ROBYT, 2000).
- Système V est constituée de n-butanol, éthanol, eau dont les proportions sont : 4-1-5 (REIFFOVA et NEMCOVA, 2006).

#### II.4.3.2.2.- Préparation des plaques chromatographiques

Pour chaque type de système, les phases stationnaires sont des plaques en gel de silice prêtes à l'emploi de type Silica gel 60 F 254 de 0,25mm d'épaisseur, étalée sur une feuille d'aluminium. Les plaques sont entièrement utilisées. Une ligne de dépôt est tracée à 1,5cm du bord inférieur de la plaque, puis activée dans l'étuve à 100°C pendant 10mn. Une fois activée, la plaque est prête pour le dépôt des échantillons (BOUAL *et al.*, 2013a).

#### II.4.3.2.3.- Préparation des cuves chromatographiques

La préparation des cuves est réalisée selon la méthode d'AUDIGIE *et al.* (1995), modifiée. La phase mobile est versée dans la cuve à une hauteur de 0,5 cm d'environ. La cuve est laissée fermée hermétiquement pendant 24h pour assurer une saturation maximale en vapeur de la phase mobile. Cette saturation a pour but de limiter l'évaporation de la phase mobile depuis la cuve chromatographique (annexe 10).

#### II.4.3.2.4.- Dépôt des hydrolysats et des étalons

Les étalons sont préparés selon BOUAL *et al.* (2013b) avec une petite modification, A chaque 10mg d'étalon (acide D-galacturonique, acide D-glucuronique, amylose, L-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, lactose, maltose, D-mannose, mannitol, mélibiose, N-acétylglucosamine, L-rhamnose, tréhalose, D-xylose) est ajouté 2,5ml d'eau distillée.

Les solutions sont déposées à l'aide d'un applicateur, en utilisant une micropipette de 10µl (AUDIGIE *et al.*, 1995).

#### II.4.3.2.6.- Développement de la plaque

Les plaques sont placées dans les cuves de sorte que la ligne de dépôt soit au-dessus de la phase mobile. La cuve est ensuite fermée pour laisser les plaques se développer avec le temps, en évitant tout déplacement ou vibration des cuves pendant l'élution. Quand le solvant arrivera à 1cm du bord supérieur, les plaques sont retirées doucement et le front du solvant est marqué avec un crayon (DELATTRE, 2005). Elles sont ensuite séchées à l'air libre et révélées par le NIGRUM à l'aide d'un pulvérisateur. Les plaques sont incubées à l'étuve à 105°C jusqu'à l'apparition des spots colorés (ou taches) environ 15min (BOUAL *et al.*, 2011).

La comparaison entre les spots des échantillons avec celles des étalons et le calcul de leurs rapports frontaux ( $R_f$ ) permet la détermination de la composition des extraits en monosaccharides (DAVID et HAZEL, 1998).

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le solvant}} \times 100$$

#### II.4.- Activités biologiques d'extrait polysaccharidique

L'extrait polysaccharidique issu de *Terfezia arenaria* est testé pour leurs activités antioxydantes, immunomodulatrices et antidiabétique.

##### II.4.1.- Activité antioxydante

Dans notre étude, nous avons utilisé deux différents tests chimiques pour mesurer l'activité antioxydante des polysaccharidiques issus de *T. arenaria*, ABTS et DPPH.

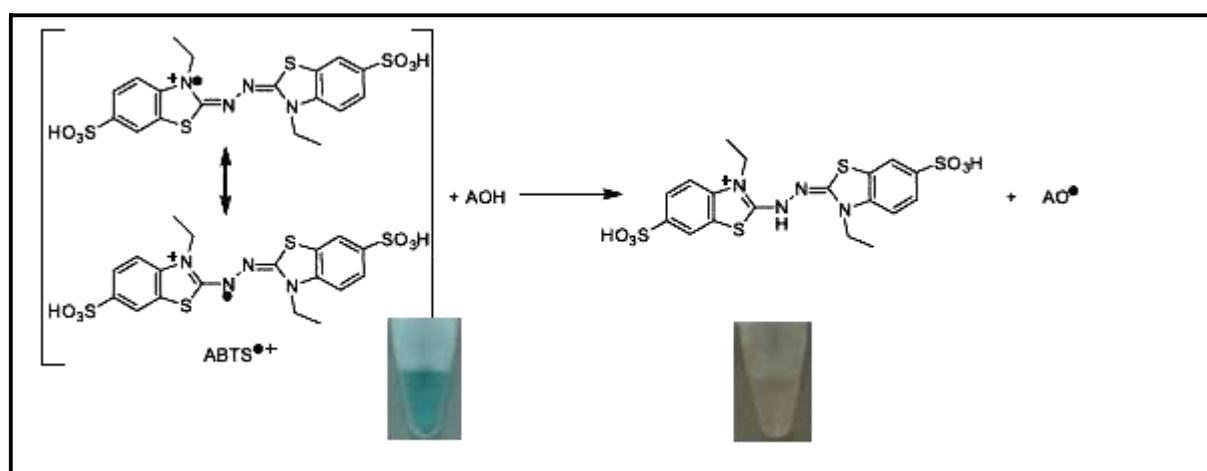
##### II.4.1.1.- Test d'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

Le test ABTS est basé sur la réduction du radical mono-cation d'ABTS préformé ( $ABTS^{•+}$ ) en présence des antioxydants considérées comme donneur d'hydrogène, ce qui conduit à une diminution de l'absorbance de la solution initiale par la perte de sa couleur verte foncée (figure 01) à 734nm (SCHAICH *et al.*, 2015 ; TAN *et al.*, 2016).

### II.4.1.1.1.- Mode opératoire

#### II.4.1.1.2.1.- Préparation des réactifs

La solution d'ABTS<sup>•+</sup> est préparée en ajoutant 7mM d'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique dissous dans l'eau distillée à une solution de persulfate de potassium 2,45mM (v/v). Le mélange est laissé réagir à la température ambiante et à l'obscurité pendant 12 à 16h avant l'utilisation (BALLESTEROS *et al.*, 2015).



**Figure 2.- Réduction de radical cation ABTS<sup>•+</sup> par l'agent antioxydant (SCHAICH *et al.*, 2015).**

Après 16h d'incubation, la solution d'ABTS<sup>•+</sup> est diluée par éthanol pour obtenir une absorbance de  $0,70 \pm 0,02$  à 734nm La dilution est préparée juste avant le dosage (LUO *et al.*, 2010).

#### II.4.1.1.2.2.- Dosage

L'activité antioxydante de l'extrait polysaccharidiques *T. arenaria* est mesurée en utilisant une méthode décrite par RE *et al.* (1999) et améliorée par BIGLARI *et al.* (2008) et BALLESTEROS *et al.* (2015).

0,1ml de différente concentration de polysaccharides *T. arenaria* (0,25 à 1mg/ml) ou de standard est ajouté à 3,9ml de solution ABTS préparée. Après une agitation vigoureuse, le mélange réactionnel est laissé reposer pendant 6min à 23°C et l'absorbance à 734nm est enregistrée immédiatement. Une courbe standard est obtenue en utilisant une solution de Trolox à différentes concentrations allant de 0,05 à 0,3mg/ml dans 80% éthanol. Les résultats sont



exprimés en équivalents Trolox (ET)/g du poids sec de matériel initial (BALLESTEROS *et al.*, 2015).

Le pourcentage d'inhibition d'ABTS<sup>•+</sup> est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition d'ABTS}^{\bullet+} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Où:

- $A_0$ : Absorbance de contrôle.
- $A_1$ : Absorbance de l'échantillon à doser ou de référence (ZHANG *et al.*, 2016).

#### II.4.1.2.- Test du radical 2,2'-diphényl picrylhydrazyle (DPPH)

##### II.4.1.2.1.- Principe de test

Le test de DPPH est basé sur la réduction d'un radical libre stable, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) dans une solution de méthanol ayant une couleur violette, en composé diphényl-picrylhydrazine ayant une couleur jaune, par un antioxydant qui comporte comme donneur d'hydrogène (SCHAICH *et al.*, 2015). L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel (BEDDOU, 2015).

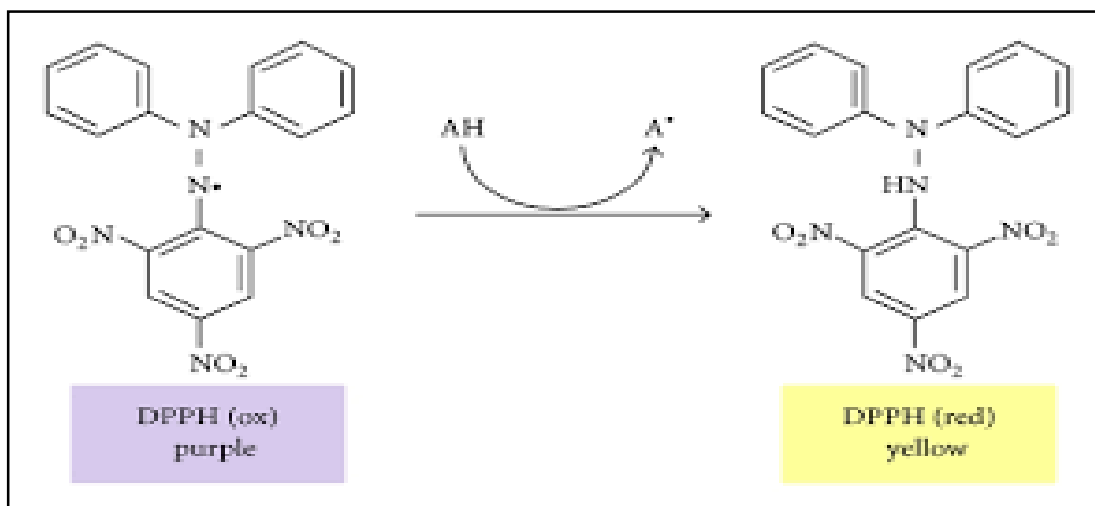
Dans sa forme radicalaire stable, DPPH<sup>•</sup> est caractérisé par une absorbance maximale à 515nm, néanmoins lors de la réduction son absorbance diminue (JIANG *et al.*, 2015).

Selon ENNEB *et al.* (2015), le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait est déterminé selon formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 \times [(A_C - A_E) / A_C]$$

Où:

- $A_C$ : Absorbance de la solution de contrôle (DPPH + méthanol).
- $A_E$ : Absorbance de l'extrait ou de référence (TROLOX).



**Figure 3.-Réduction de radical libre DPPH<sup>•</sup> par l'agent antioxydant (TALBI *et al.*, 2015).**

#### II.4.1.2.2.- Mode opératoire

##### II.4.1.2.2.1.- Préparation des réactifs

Selon YAN *et al.* (2015) et avec légères modifications, une solution de DPPH<sup>•</sup> à 63,5 $\mu$ M est préparée en dissolvant 2,5mg de DPPH dans 100ml de méthanol 80%. Cette solution préparée est par la suite diluée dans le méthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance proche de 1 à 515nm (SCHAICH *et al.*, 2015).

##### II.4.1.2.2.2.- Dosage

La capacité de polysaccharides issus de *T. arenaria* à piéger les radicaux libres DPPH est déterminée selon la méthode décrite par POPOVICI *et al.* (2009) et BALLESTEROS *et al.* (2015) avec quelques modifications. 100 $\mu$ l de différentes concentrations de polysaccharides *T. arenaria* sont additionnés à 3,9ml de solution DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Après une agitation vigoureuse, le mélange est incubé pendant 30mn à l'obscurité et la lecture des absorbances est effectuée à 515nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le méthanol est utilisé comme un blanc.

La courbe d'étalonnage est obtenue en utilisant une solution standard de Trolox à différentes concentrations allant de 0,05 à 0,5mg/ml (MUSA *et al.*, 2013 ; BALLESTEROS *et al.*, 2015).

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH et déterminée selon l'équation décrite précédemment.

## **II.4.2.- Activité phagocytaire**

### **II.4.2.1.- Principe de test**

Le test phagocytose est fondé sur l'activation des cellules phagocytaires par les polysaccharides. Ce test est réalisé afin de déterminer l'augmentation de la capacité de leucocytes à phagocyter les particules après une stimulation par des extraits polysaccharidiques de *T. arenaria* (HARUN *et al.*, 2015).

### **II.4.2.2.- Prélèvement de sang**

Le sang est acquis à partir des volontaires sains, de sexe masculin et d'âge 25 à 38 ans, par une ponction veineuse aseptique (KOKO *et al.*, 2008) et pendant le même jour de test niveau de laboratoire IBN ROCHD Ghardaïa.

Un tube contenant le sodium héparine comme anticoagulant est utilisé pour recueillir le sang total (MAQBOOL *et al.*, 2011).

### **II.4.2.3.- Préparation de *Candida albicans***

L'inoculation de *Candida albicans* est faite dans un milieu liquide de Sabouraud à partir d'une culture mère maintenu sur la gélose inclinée de Sabouraud. Ensuite, elle est laissée pendant une nuit à 30°C. Cette technique permet d'obtenir le *C. albicans* sous forme de levure. La culture est centrifugée à 400g pendant 10mn (GHONEUM et GOLLAPUDI, 2004).

Le culot est lavé deux fois avec 1ml de tampon PBS stérile et centrifugé à 460g à 4°C pendant 10mn, puis l'incubation est effectuée pendant 1h à 90°C pour tuer les *C. albicans* (GHONEUM et GOLLAPUDI, 2004). Les levures mortes sont laver deux fois dans 1ml de PBS et centrifugé (RAGSDALE et GRASSO, 1989).

La mesure de l'absorbance à 540nm permet l'estimation de concentration de cellules dans le PBS. L'absorbance est ajusté à 1,0 qui correspond à  $1 \times 10^7$  blastoconidies de *C. albicans*/ml, approximativement (GHONEUM et GOLLAPUDI, 2004 ; TAVANTI *et al.*, 2006).

#### II.4.2.4.- Préparation des solutions tampons

##### II.4.2.4.1.- Tampon phosphate saline (PBS)

PBS est une solution saline à des concentrations ioniques correspondent à celles du corps humain. C'est un milieu isotonique et non toxique pour les cellules vivantes (HEAKAL *et al.*, 2014).

##### II.4.2.4.1.1.- Composition de PBS

La préparation de PBS est réalisée au pH 7,4 (HEAKAL *et al.*, 2014) dans 1000 ml d'eau bi-distillée. La température de la solution est maintenue à 37°C (DALMAU *et al.*, 2015 ; GUIÑÓN PINA *et al.*, 2015).

**Tableau 4.- Composition de PBS selon BURNAT *et al.* (2013)**

Composants	quantité (g.l <sup>-1</sup> )
NaCl	8
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2

##### II.4.2.4.1.2.-Préparation de PBS

Les composants sont ajoutés à l'eau distillée et le volume est amené jusqu'à 1000 ml. Après une bonne agitation, le pH est ajusté à 7,4. Le tampon est stérilisé à l'autoclave pendant 15mn à une pression de 1 bar, à une température de 121°C et conservé à 25°C (ATLAS, 2010).

##### II.4.2.4.2.-Solution de Hanks

D'après NAOUN. (2014), la solution de Hanks connu sous le nom de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) qu'est une solution très délicate à fabriquer. Les étapes décrites pour la préparation de Hanks sont exécutées minutieusement.

**II.4.2.4.2.1.-Composition de la solution de Hanks**

La solution saline de Hanks est préparée à pH 7,4 dans 1000 ml d'eau distillée (HANKS, 1975)

**Tableau 5.- Composition de solution Hanks selon HANKS (1975)**

Composants	Quantité (g.l <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub>	1,4
NaCl <sub>2</sub>	80
KCl	4,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
Glucose	10,0
Rouge de phénol 0,2%	0,4
NaHCO <sub>3</sub>	3,5

**II.4.2.4.2.2.- Préparation de solution de HANKS (HANKS, 1975)**

Trois solutions sont préparées.

➤ **Solution A**

Dans un bécher, 1,4g de CaCl<sub>2</sub> est dissous dans un 200ml d'eau distillée glacée et dans un autre bécher de 1000ml contenant 800ml d'eau distillée glacée, les ingrédients restant sont ajoutées à l'exception de NaHCO<sub>3</sub>, puis une agitation est effectuée jusqu'à dissolution.

Les deux solutions sont mélangées et une quantité d'eau distillée est ajouté jusqu'à rendre le volume total égale à 1100ml en fournissant 10% d'excès d'eau pour compenser les pertes durant l'autoclavage.

➤ **Solution B**

Afin de préparer une solution de rouge de phénol à 0,2%, 200ml d'eau distillée glacée est ajoutés à 0,4g de rouge phénol. Puis la solution ainsi préparée est autoclavée.

➤ **Solution C**

La préparation de la solution isotonique de NaHCO<sub>3</sub> à 1,4% est effectuée par la dissolution de 3,5g de NaHCO<sub>3</sub> dans 250ml d'eau distillée glacée suivie par une autoclavage. Cette solution est utilisée pour l'ajustement de pH.

#### **II.4.3.5.- Préparation de polysaccharides**

La fraction polysaccharidique de *T. arenaria* est testée pour leurs capacités d'activer la phagocytose de *C. albicans* par les leucocytes humains (POPOV *et al.*, 1999).

L'extrait polysaccharidique est préparé dans la solution de Hanks pour une concentration de 1mg.ml<sup>-1</sup>. (NERGARD *et al.*, 2005).

#### **II.4.3.6.- Préparation de zymosan**

Le zymosan est un dérivé de la membrane des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, il s'agit d'un complexe des protéines et des glucides notamment du β-D-glucane. Un β-glucane est constitué de résidus glucose liés par des liaisons osidiques β-1,3 (SATO *et al.*, 2005).

Afin de mesurer la phagocytose *in vitro*, FREIRE-GARABAL *et al.* 1993 ont utilisé le test au zymosan comme contrôle positif à une concentration de 1mg.ml<sup>-1</sup> (EDVARD *et al.*, 1978).

#### **II.4.3.7.- Exploration de la phagocytose et récupération des cellules phagocytaires (protocole modifié)**

La solution polysaccharidiques (40μl) est mélangée avec 200μl du sang hépariné et incubés dans un incubateur avec agitation (60rpm) à 37°C pendant 30min. Puis, les tubes sont mis sur la glace pour arrêter la réaction (HARUN *et al.*, 2015). Les cellules stimulées sont

lavées deux fois par 1ml de PBS (CHEN *et al.*, 2015) froide (4°C) , puis centrifugé à 250g pendant 5min à 4°C (ROSSI *et al.*, 2013).

40µl de solution de *Candida albicans* est ajoutée au mélange des échantillons à 0°C. Les échantillons sont incubés dans un incubateur avec agitation à 37°C pendant 10min. Tandis que, pour le contrôle négatif les échantillons sont placés sur la glace (HARUN *et al.*, 2015).

Après l'incubation, la phagocytose est arrêtée par l'addition de 2ml de PBS froide, et les cellules sont ensuite lavées trois fois par 1ml de PBS froide (CHENA *et al.*, 2014) puis centrifugées trois fois à 100g pendant 5min à 4°C (CZUPRYNSKI *et al.*, 1991).

#### II.4.3.8.- Lyse des érythrocytes

Les érythrocytes sont lysés par 2ml d'une solution de lyse pour obtenir une population pure de granulocytes (MAQBOOL *et al.*, 2011).

La lyse des hématies est effectuée une fois pendant 20sec (le temps est strictement contrôlé en utilisant un chronomètre) par la solution HSi d'hémolyse et de lavage (Réf : 018431L, TOSOH EUROPE, Belgique). Le processus de lyse est arrêté en utilisant 2ml d'un tampon HBSS suivi d'une centrifugation à 400g pendant 10min, ensuite les échantillons sont lavés deux fois par 3ml de PBS (HARUN *et al.*, 2015).

**Tableau 6.- Test de phagocytose**

<b>Concentration</b>		<b>1mg/ml</b>
<b>Contrôle positif</b>	Sang total (µl)	200
	Zymosan (µl)	40
	<i>Candida albicans</i>	40
<b><i>Terfezia arenaria</i></b>	Sang total (µl)	200
	Polysaccharides (µl)	40
	<i>Candida albicans</i>	40
<b>Contrôle négatif</b>	Sang total (µl)	200
	Solution de Hanks (µl)	40
	<i>Candida albicans</i>	40

#### **II.4.3.9.- Préparation de frottis sur lame**

La préparation des frottis se fait selon la méthode de ROUËSSE (2002). A l'aide du compte-goutte, 50 µl de chaque culot cellulaire est prélevé et ensuite déposé à l'extrémité d'une lame en verre propre. L'étalement est fait par une autre lame et à la fin les frottis sont séchés à l'air libre (MOINFAR *et al.*, 2012).

#### **II.4.3.10.- Fixation par le méthanol**

La fixation des cellules étalées est faite en versant quelques gouttes de méthanol sur la lame pour une durée de 2min (NORUM *et al.*, 2005 ; PONTE *et al.*, 2012).

#### **II.4.3.11.- Coloration de MGG**

La coloration de May-Grünwald-Giemsa repose sur un mélange de colorants (éosine, bleu de méthylène et azur). Il s'agit en fait d'une coloration en deux temps, en milieu alcoolique puis aqueux (SEBAHOUN, 2005).

##### **II.4.3.11.1.- Principe de coloration**

Une coloration standard utilise la méthode de May-Grünwald-Giemsa (WILDEMANN et OSCHMANN, 2011) repose sur l'interaction entre l'éosine G et un complexe ADN azur B. Les deux colorants forment un complexe (MERCK, 2008).

Les noyaux apparaissent en différents degrés de coloration mauve et le cytoplasme en différents degrés en bleu, ce qui permet de différencier les structures individuelles (WILDEMANN et OSCHMANN, 2011).

L'intensité de la coloration dépend de la teneur en azur B et du rapport azur B- éosine G. Le résultat de la coloration peut être influencé par divers facteurs comme le pH de la solution et de la solution tampon, les substances tampons, le temps de coloration et de fixation (MERCK, 2008).



**II.4.3.11.2.- Préparation de la coloration MGG (MERCK, 2008)****➤ Solution d'éosine-bleu de méthylène à partir de colorant selon May-Grünwald**

Une quantité de 0,25g d'éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald est dissous dans 100ml de méthanol, suivi d'un léger chauffage dans un bain Marie à 60°C. Après agitation durant 1h, la solution est laissée reposer 24h puis filtrer.

La dilution de la solution de May-Grünwald est s'effectuée pour la coloration manuelle, en mixant 30ml de solution éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald avec 150ml d'eau distillée et 20ml de solution tampon.

**➤ Solution de Giemsa diluée pour la coloration manuelle**

Une dilution de 10ml de solution azur-éosine-bleu de méthylène de Giemsa se fait dans 190ml de solution tampon. Après mélange, la solution est laissée reposer 10min et filtrée si nécessaire.

**II.4.3.11.3.- Procédure de la coloration May-Grünwald-Giemsa (NORUM et al., 2005 ; WILDEMANN et al., 2011)**

La préparation cellulaire est séchée à l'air suivi par le couvrement de par une solution de May-Grünwald-Giemsa (éosine avec bleu de méthylène) frottis pendant 3min. L'excès de colorant est éliminé en rinçant avec l'eau du robinet. Ensuite le frottis est couvert une autre fois avec une solution fraîche de Giemsa filtré (la solution standard diluée à 1:10 avec l'eau du robinet) pendant 15 à 20min. Le frottis est lavé rapidement avec l'eau du robinet et séché à l'air.

**II.4.3.12.- Lecture du frottis sous microscope**

Après séchage, les lames sont examinées après l'addition de quelques gouttes de l'huile d'immersion (GHONEUM et GOLLAPUDI, 2004) au microscope optique par un grossissement de 1000 fois (GIAIMIS *et al.*, 1992).

**II.4.3.13.- Calcul de la capacité phagocytaire**

Une centaine de cellules adhérentes sont comptés pour déterminer le pourcentage de la phagocytose à l'aide d'un microscope optique. Les valeurs de phagocytose représentent le

pourcentage des cellules qui contiennent des particules zymosan ou des levures intériorisées. (NOSE *et al.*, 1997 ; POPOV *et al.*, 1999 ; ABID *et al.*, 2012).

La capacité phagocytaire était représentée comme suit :

$$\text{CP\%} = (\text{Nombre de cellules ingérées} / \text{Nombre totale}) \times 100\%$$

Où:

- CP: Capacité de phagocytose.
- Nombre de cellules ingérées : les macrophages phagocytaires de levures ou zymosan.
- Nombre totale : les macrophages choisis pour le calcul.

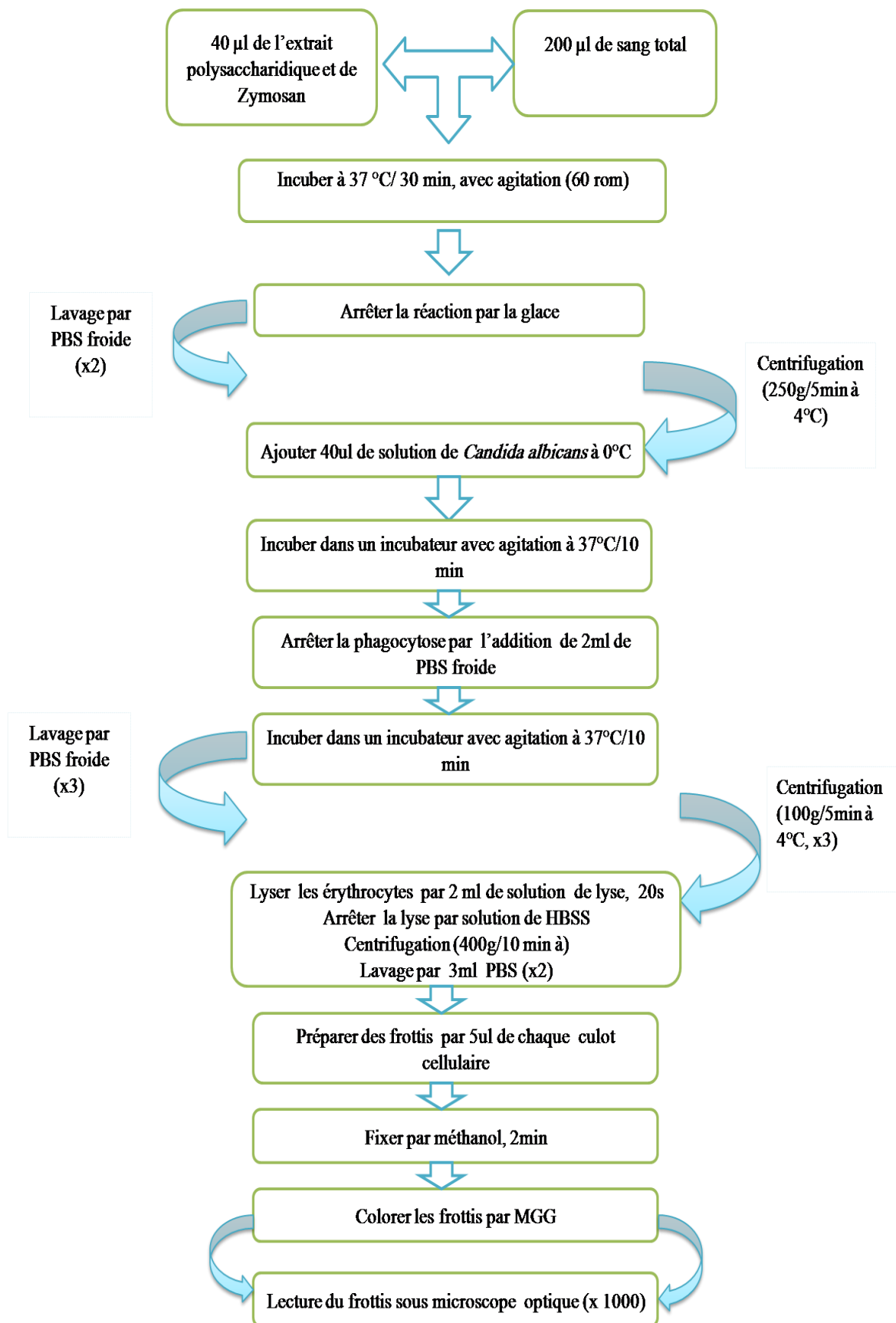
#### II.4.3.14.- Calcul de l'activité phagocytaire

Après calcul du degré de phagocytose du contrôle positive, des polysaccharides et du contrôle négatif. L'activité phagocytaire des polysaccharides et celle de contrôle positive est calculé selon STEVEN *et al.* (1984) comme suit:

$$\text{PA\%} = (\text{CP test \%}) - (\text{CP blanc \%})$$

Où:

- PA%: activité phagocytaire catalysé par les polysaccharides et du contrôle positif.
- CP test %: capacité de phagocytose en présence des polysaccharides ou bien le contrôle positif.
- CP blanc% : capacité de phagocytose en absence des polysaccharides ou bien le contrôle négatif.



---

**Figure 4.- Différentes étapes du test de phagocytose**

### II.4.3.- Activité antidiabétique

#### II.4.3.1.- Principe

Afin de déterminer l'activité antidiabétique des polysaccharides extraits à partir de *Terfezia arenaria*, nous avons mesurés le taux d'inhibition de l'enzyme alpha D-glucosidase (E.C.3.2.1.20) (MOSIHUZZMAN *et al.*, 2013).

L'inhibition est effectuée selon la méthode de OKI *et al.*(1999), en utilisant p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) comme substrat (QIAN *et al.*, 2015), qui est hydrolysé par  $\alpha$ -glucosidase pour libérer le glucose et le p-nitrophénol (Schumann *et al.*, 2006). Ce dernier est un agent coloré qui peut être surveillée à 405nm (LAOUINI, 2014).

Cette expérience est utilisée pour déterminer la diminution de la capacité de l'enzyme à hydrolyser leur substrat en présence de polysaccharide de *T. arenaria*. L'acarbose est utilisé comme un contrôle positif, alors que l'eau distillée est utilisée comme contrôle négatif. L'activité inhibitrice de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase est calculée d'après la formule suivante (ZHANG *et LI*, 2015).

$$\% \text{inhibition} = \frac{\Delta A_{\text{contrôle}(-)} - \Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{contrôle}(-)}} \times 100$$

Où:

- $\Delta A$  contrôle (-) : Différence d'absorbance de contrôle (-).
- $\Delta A$  échantillon : Différence d'absorbance d'essai d'extrait ou de contrôle (+).

#### II.4.3.2.-Mode opératoire

L'activité antidiabétique des polysaccharides de *Terfezia arenaria* est déterminée en utilisant une méthode de l'inhibition de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase tel qu'est décrit par OKI *et al.* (1999), BISHT *et al.* (2013) et QIAN *et al.* (2015) avec une légère modification.

Dans un tube sec, un volume de 500 $\mu$ l de solution de  $\alpha$ -glucosidase (0,2U/ml) est ajouté à 10 $\mu$ l de différentes concentrations de polysaccharides (10mg/ml à 100mg/ml) ou d'acarbose (0,001M à 0,1M). Le mélange résultant est incubé à 37°C pendant 15min sous agitation. Après

l'incubation, 125µl de PNPG (8,5mmol/l) préparés dans 0,1mol/l de phosphate tampon (pH=7.15) est additionné. Après 2min d'incubation, La lecture des densités optiques sont effectuées chaque 12sec pendant 3min à 405nm par un spectrophotomètre UV-visible. L'activité inhibitrice de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase est généralement exprimée par la détermination d'IC50, qui correspond à la concentration qui inhibe 50% de l'activité de l'enzyme, à partir de la courbe présentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de polysaccharides de *T. arenaria*.

# *Chapitre III.-*

---

## *Résultats et discussions*

### III.1.- Caractérisations physico-chimiques et biochimiques de *Terfezia arenaria*

Les résultats d'analyses physico-chimiques effectués sur *Terfezia arenaria* sont représentés dans le tableau 07.

**Tableau 7.- Composition physico-chimique et biochimique du matériel d'étude.**

Composant		Teneur
Sels minéraux <sup>a</sup>	Na <sup>+</sup>	266,7±152,8
	K <sup>+</sup>	4633,33±230,94
Cendres <sup>b</sup>		9,65±0,4
Protéines <sup>b</sup>		24,9± 2,8
Sucres réducteurs <sup>b</sup>		0,6
Polyphénols totaux <sup>c</sup>		1,13±0,43
Flavonoïdes <sup>d</sup>		0,23±0,02
Lipides <sup>b</sup>		3,83±0,76
Acidité titrable <sup>e</sup>		50±0,00

<sup>a</sup> : teneur en ppm, <sup>b</sup> : teneur en %, <sup>c</sup> : teneur en mg GAE/g de la matière sèche, <sup>d</sup> : teneur en mg RE/g de la matière sèche, <sup>e</sup> : teneur en ml NaOH E/100 g de matière.

La teneur en cendres moyenne représente la somme des différents constituants inorganiques (KRUSSELYI et VETTER, 2014). BOUKHARY et PARVY (1993) et HAMZA *et al.* (2013) signalent une quantité de cendres plus faible, soit 4% de *Terfezia clavery* (Arabie saoudite) et 4,49g/100g de *Terfezia boudieri* (Tunisie) respectivement, à celle de *Terfezia arenaria* (9,65%). Par contre, KAGAN-ZUR *et al.* (2014) annoncent un pourcentage de 12,88% de *Terfezia boudieri* (Libye). Cette quantité en cendres, semble plus supérieure, par rapport à celle de *T. arenaria*.

Au vu des résultats, les teneurs en Potassium et en Sodium de *T. arenaria* sont de 4633,33±230,94ppm, et 266,7±152,8ppm respectivement. Elles sont inférieures à celle de *Terfezia boudieri* (Tunisie) soit 1512,60±1,41mg/100g et 26,89±0,78mg/100g rapportées par HAMZA *et al.* (2013). De même, le taux de Potassium trouvé par BOKHARY *et al.* (1987) chez *Tirmania nivea*, *Tirmania pinoyi* et *Terfezia boudieri*, soit 12,7±1,91mg/g, 11,89±0,83mg/g et 9,63±0,04mg/g, apparaît supérieure à celui de notre échantillon. En



revanche, AKYÜZ (2013) et aussi KRUSSELYI et VETTER (2014) annoncent une teneur en sodium faible, soit  $207,5 \pm 5,6$  mg/kg de *Terfezia boudieri* (Turquie) et  $148,2 \pm 40,6$  mg/kg de *Tuber aestivum* respectivement, à celle de *T. arenaria* (266,7 ppm). Néanmoins, chez *Tirmania pinoyi*, *Terfezia boudieri* et *Tirmania nivea*, le taux de Sodium est relativement plus élevé soit  $0,55 \pm 0,22$  mg/g,  $0,60 \pm 0,11$  mg/g et  $0,68 \pm 0,00$  mg/g (BOKHARY *et al.*, 1987).

Les résultats du tableau 07, montrent que la matière sèche de *T. arenaria* contient  $24,9 \pm 0,28$ % des protéines. Cette teneur semble supérieure à celle de *Tuber aestivum* et *Terfezia boudieri* (Turquie), soit  $19,11 \pm 1,27$ % et  $20,13 \pm 0,35$ % respectivement (AKYÜZ, 2013 ; KRUSSELYI et VETTER, 2014). Encore, STOJKOVIC *et al.* (2013) remarquent un taux de protéines inférieur, soit  $8,06$  g/100 g  $\pm 0,79$  de *Tirmania pinoyi* (Libye), comparativement à de *T. arenaria*. Ainsi, KAGAN-ZUR et ROTH-BEJERANO (2008) ont étudié la composition chimique de truffes du désert, constatant que la matière sèche est composée de 20 à 27% de protéines.

Les différences de concentrations en protéines entre les différentes espèces pourraient être probablement dues à la différence méthodes de dosage des protéines. Nous avons utilisé pour déterminer la teneur en protéines de la matière sèche de *T. arenaria* la méthode de  $\mu$ Bradford tandis les auteurs précédents ont le déterminé par la technique de KJELDAH. Cette dernière est peu spécifique à celle de Bradford, car elle est basée sur la mesure d'azote totale donc elle ne fait pas de distinguer entre les différentes sources d'azote.

L'extrait éthanolique de *T. arenaria* renferme soit 0,6% de sucres réducteurs. SARITHA *et al.* (2016) notent une quantité de 0,28% dans des champignons à l'état frais. Cette teneur semble inférieure à celle de *T. arenaria*.

Il est remarqué que, les fractions de lipide obtenues à partir de *T. arenaria* sont de  $3,83 \pm 0,76$ %. Elles sont plus proche de celles rapportées par AKYÜZ (2013) chez *Terfezia boudieri* (Turquie), soit  $3,45 \pm 0,03$ %. Par contre, STOJKOVIC *et al.* (2013) et HAMZA *et al.* (2013) signalent une teneur en lipides supérieure, soit  $4,09$  g/100 g  $\pm 0,20$  de *Tirmania pinoyi* (Libye) et  $8$  g/100 g  $\pm 1,30$  de *Terfezia boudieri* respectivement, à celle de *T. arenaria*. En plus, AI-SHABIBI *et al.* (1982) et KRUSSELYI et VETTER (2014) montrent une quantité en matière gras inférieure, soit 1,8% de *Terfezia hafiz* (Irak), 2,5% de *Terfezia clavery* (Irak) et 2,27% de *Tuber aestivum* respectivement, à celle de *T. arenaria*.

La teneur moyenne en polyphénols totaux a été rapportée en mg équivalent d'acide gallique par g de matériel sec. L'extrait éthanolique de *T. arenaria* renferme de  $1,13 \pm 0,43 \text{ mgGAE/g}$  de la matière sèche. BEARA *et al.* (2014) signalent des teneurs semblent supérieure, dans l'extrait méthanolique de *Tuber magnatum* et de *Tuber aestivum* (Serbie occidentale), soit  $12,69 \pm 0,65 \text{ mgGAE/g}$  et  $15,14 \pm 0,46 \text{ mgGAE/g}$  respectivement, à celles de *T. arenaria*. De même, l'extrait éthanolique de *Tuber aestivum* (Hongrie) n'en contient que  $2,8 \text{ mgGAE/g}$ , ce taux est relativement proche à celui de notre échantillon (KRUSSELYI et VETTER, 2014).

Parallèlement, le taux en flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *T. arenaria* est de  $0,23 \pm 0,02 \text{ mgRE/g}$  de la matière sèche. KUKA et CAKSTE (2011) notent une quantité relativement proche, soit  $0,13 \text{ mgQE/g}$  dans l'extrait méthanolique de *Boletus edulis f. beticola*. En plus, l'extrait éthanolique de *Tuber aestivum* renferme des quantités inférieures en flavonoïdes totaux de  $0,093 \text{ mg/g}$  à celle de *T. arenaria* (KRUSSELYI et VETTER, 2014). Par contre, BEARA *et al.* (2014) remarque un taux semble supérieure en comparaison avec l'extrait de *T. arenaria*, soit  $3 \text{ mgQE/g} \pm 0,41$  chez *Tuber magnatum*.

A la lumière de résultats, les teneurs en lipides, en phénols totaux et en flavonoïdes sont fortement affectées par les solvants d'extraction (BOUAL, 2014). Ainsi, l'élévation de la teneur en métabolites secondaires pourrait être due aux changements géo-climatiques non habituelles pour cette essence. En effet, ces biomolécules jouent un rôle important dans la protection des flores végétative vis-à-vis des différentes agressions de l'environnement et peuvent être de ce fait soumises à d'importantes fluctuations (TALBI *et al.*, 2015).

On note que, l'estimation des acides gras à court chaîne, se fait par la mesure de l'acidité titrable, atteint de  $50 \pm 0,00 \text{ ml NaOH E/100g}$  de matière. BOKHARY *et al.* (1987) annoncent une quantité, soit  $55,76 \pm 1,06 \text{ ml NaOH E/100g}$  de *Tirmania nivea* et  $62,13 \pm 1,04 \text{ ml NaOH E/100g}$  de *Terfezia boudieri* respectivement. Ces teneurs semblent supérieures à celle de *T. arenaria*.

Les compositions chimiques d'une même espèce de truffes diffèrent selon leur région de récolte. Encore, cette diversité est probablement due aux nombreux facteurs environnementaux tels que la quantité de pluie, le temps, les types de sols et les changements climatiques (ABDUL MAJID *et al.*, 2016). Selon AKYÜZ (2013), les éléments minéraux contenant dans les champignons sont liés à la constitution minérale de sol.

### III.2.- Composition de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble

Le tableau 08 présente le rendement et la composition de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble de *T. arenaria*. Le rendement d'extraction obtenu en termes d'extrait polysaccharidique sec est de 9,45%. LUO *et al.* (2011) rapportent un rendement inférieur de polysaccharides hydrosolubles extraite à partir de matière fraîche lyophilisé de *Tuber indicum*, soit 2,91%. Cependant, MIAO *et al.* (2011) ont montré un rendement supérieur dans des conditions optimales de l'extraction chez les truffes chinoises, allant de 12,89% jusqu'à 13,03%. Ils ont trouvé que la température, le temps, et le pH sont des facteurs affectant le rendement massique de l'extraction (MIAO *et al.*, 2011) ainsi que le rapport du solvant par rapport à la matière première (BOUAL, 2014).

**Tableau 8.-** Rendement et compositions de l'extrait polysaccharidique hydrosolubles de *T. arenaria*.

Rendement (%)	Protéines (%) (LOWRY)	Protéines (%) (BRADFORD)	Teneur en oses (%)		
			Totaux	Acides	Neutre
9,45	32,14±2,95	17,27±1,48	60,11±2,28	3,22±0,11	97,4±2,26

Selon les résultats obtenus, les oses totaux présentent les composants majeurs de l'extrait polysaccharidique hydrosolubles avec une teneur de 60,11% qui est proche à celui de *Terfezia boudieiri*, soit 62,03% (HAMZA *et al.*, 2013). De même, SARITHA *et al.* (2016) indiquent un taux en oses totaux situe entre 50-65%. D'autre part, des teneurs plus élevées en oses totaux remarqué chez les fractions 1 et 2 de polysaccharides hydrosolubles de *Tuber indicum*, soit de 95,4% et 96,1% après purification par DEAE cellulose, respectivement.

Les teneurs en oses neutres et en oses acides sont successivement 7,45%, et 3,22%. HARKI *et al.* (2006) ont signalé 11,2% d'oses acides chez *Tuber melanosporum* immature, semble supérieur à celui de *Terfezia arenaria*. Alors que le teneur en oses neutres soit 68,9% chez *Tuber melanosporum* immature semblent inférieur à celles de *T. arenaria*.

En revanche, lors de stade de maturation de *Tuber melanosporum*, le taux des oses acides est de 2,8% proche à celui de *T. arenaria* (3,22%). Alors que le taux des oses neutres de *Tuber melanosporum* soit 80,9% reste inférieur à celle de *T. arenaria*.

La teneur en protéines a été déterminée par deux méthodes LOWRY *et al.* (1951) et BRADFPD *et al.* (1976) qui est de 17,27% et 32,14% respectivement. Chez *Tuber melanosporum* immature, HARKI *et al.* (2006) ont signalés une teneur en protéines déterminé par la méthode de LOWRY de 59% qui semble supérieur à celle de *T. arenaria* soit 17,27%. Cependant que, la teneur de protéines de *Tuber melanosporum* mature est de 16,3% qui semble inférieur à celle de *T. arenaria*.

Les teneurs de *T. arenaria* en protéines selon LOWRY semblent anormalement élevées. Sachant que, la méthode de Lowry est basée sur des réactions d'oxydo-réduction, ce qui laisse suspecter l'interférence d'autres composés tel que les polyphénols. On suggère donc d'effectuer un autre procédé pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus.

Les dissemblances en composant observés peuvent être dues à des différence dans l'extraction, purification ainsi que la période de récolte du truffes (HARKI *et al.*, 2006). On considère que cette diversité des composées est probablement dues aux manque de pluie, la sécheresse et la variabilité climatique marqué durant cette année dans la région de récolte.

### **III.3.- Caractérisation par CCM des oses constitutifs de l'extrait méthanolique et de polysaccharides**

Afin de caractériser les différents composés en oses de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble et de l'extrait méthanolique de *T. arenaria* et de déterminer leurs nature, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée.

Différentes systèmes sont utilisés pour obtenir des meilleurs résultats dont le système 1 (acétate d'éthyle, pyridine, eau, n-butanol et l'acide acétique) est utilisé pour la séparation des acides uroniques, le système 2 (n-butanol, méthanol, l'acide acétique, eau) est utilisé pour la séparation des oses neutres, le système 3 (acétate d'éthyle, acide acétique, eau) est effectué pour la séparation des mono-, di- et oligosaccharides et le système 4 (acétonitrile, acétate d'éthyl, propanol et eau) est utilisé pour la séparation des alditols.

Les résultats de chromatographie d'extrait polysaccharidique de *T. arenaria* obtenus ainsi que les différents étalons utilisés dans les quatre systèmes sont consignés dans le tableau 09.

**Tableau 9.- Résultats de CCM de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble obtenus et les différents étalons utilisés dans les quatre systèmes.**

	Système 1	Système 2	Système 3	Système 4	Etalons
	Spot	Spot	spot	spot	
<b>Extrait polysaccharidique de <i>T. arenaria</i></b>	+	--	+	+	A.D-Gal
	+	--	--	--	A.D-Glc
	--	--	--	--	L.Ara
	--	--	--	--	D.Gal
	+	+	+	+	D.Glc
	--	--	--	--	D.Man
	--	--	--	--	L.Rham
	--	--	--	--	D.Xvl
	/	/	--	--	Lactose
	/	/	--	--	Mannitol
	/	/	/	--	D.fructose
	/	/	/	--	Tréhalose
	/	/	/	--	GlcNAc
	/	/	/	--	Maltose
	/	/	/	+	Mélibiose
/	/	/	--	Amylose	

(+) : Présence

(--): Absence

(/): n'est pas utilisé dans le système

On note que les mêmes systèmes et étalons sont utilisés pour l'extrait méthanoliques.

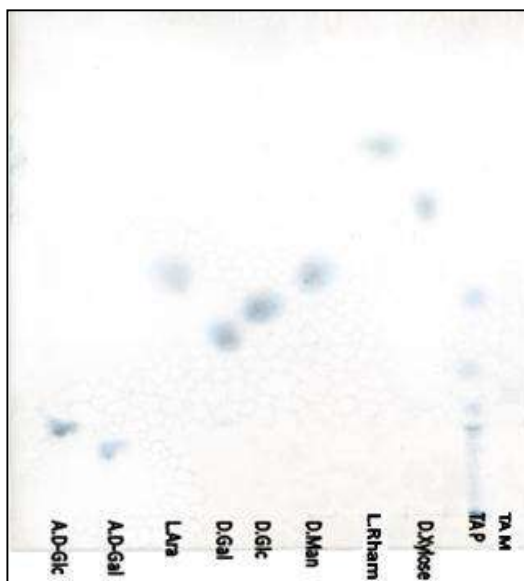
L'analyse de chromatogramme de premier système révèle la présence de 05 taches dans l'extrait de polysaccharide hydrosolubles de *T. arenaria*.

Seulement 03 taches sont apparues de  $R_f$  0,40, 0,17 et 0,13 correspondant aux D-glucose, acide D-glucuronique et l'acide D-galacturonique, respectivement. Deux taches non identifiés de  $R_f$ : 0,28 et 0,26.

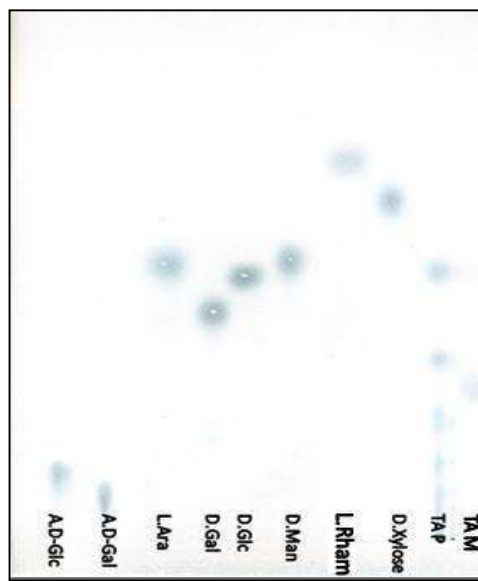
Dans le deuxième système, le profil de CCM marque la présence de 04 taches. Une seule tache dans l'extrait polysaccharidiques hydrosolubles de *T. arenaria* est identifiée de  $R_f$ : 0,46 correspondant au D-glucose. Les autres taches présentes les  $R_f$  suivants : 0,31, 0,21, et 0,13.

La lecture de chromatogramme de l'extrait polysaccharidique de *T. arenaria* de troisième système révèle la présence de 05 taches. Uniquement 02 taches sont distinguées de  $R_f$  0,56 pour D-glucose et de 0,45 pour l'acide D-galacturonique. Les 03 taches non identifiables ont un  $R_f$  de 0,20, 0,27 et 0,35. Le profil de CCM de système 04 de polysaccharide hydrosoluble de *T.*

*arenaria* marque 04 taches. Les 03 taches de  $R_f$  0,46, 0,18 et 0,08 correspondant aux D-glucose, mélibiose et l'acide D-galacturonique, respectivement. Ainsi une seule tache non identifié.



**Figure 5a.-** Chromatogramme de *T. arenaria* du système (01)



**Figure 5b.-** Chromatogramme de *T. arenaria* du système (02)



**Figure 5c.-** Chromatogramme de *T. arenaria* du système (03)



**Figure 5d.-** Chromatogramme de *T. arenaria* du système (04)

**Figure 5.-** Chromatogramme de deux extraits polysaccharidiques et méthanoliques de *Terfezia arenaria* dans les 04 systèmes par CCM.

**TAM :** extrait méthanolique, **TAP :** extrait des polysaccharides hydrosoluble.

En outre, dans l'extrait méthanolique aucune tache est correspond aux étalons apparue dans les chromatogrammes de trois systèmes 1, 2 et 3 dont, le système 1 et 2 révèle la présence d'une seule tache de  $R_f$ : 0,22 et 0,27 respectivement. Alors que, dans le système 03 deux taches sont apparues de  $R_f$  : 0,55 et 0,40. En outre, la lecture de chromatogramme de système 4 révèle la présence d'une seule tache de  $R_f$ : 0,25 correspondant au tréhalose. Il est souhaitable donc de suivre l'identification par d'autres techniques d'analyse à savoir la CG/MS et /ou l'HPLC afin de déterminer la nature et la ration des oses.

On observe l'existence de glucose dans les quatre systèmes. Alors que l'acide D-galacturonique est présenté dans les systèmes 1, 2 et 4. L'acide D-glucuronique est présenté seulement dans le système 1. Le mélibiose est apparait uniquement dans le système 4 pour les polysaccharides hydrosoluble de *T. arenaria*.

Les chromatogrammes montrent l'existence des taches grises et moins dense correspondant aux D.glucose, acide D-galacturonique, l'acide D-glucuronique et le mélibiose pour l'extrait polysaccharidique hydrosoluble de *T. arenaria*. Or, une seule tache grise est apparait correspondant au tréhalose dans l'extrait méthanolique de *T. arenaria*.

L'extrait polysaccharidiques hydrosolubles de TA renferme des oses neutre et acides composé de D.glucose, acide D-galacturonique, l'acide D-glucuronique ainsi que une trace de mélibiose et apparait clairement dans le système 4. On a constaté que le D.glucose est le composant majeur de l'extrait polysaccharidique de *T. arenaria* d'où il est présenté dans les quatre systèmes. Le tréhalose est l'un des compositions en sucre de *T. arenaria*.

WU *et al.*, (2013) ont rapporté trois composants ; l'acide glucuronique, le galactose et le glucose dans les polysaccharides hydrosolubles de *Pleurotus tuber-regium sclerotia*. MIAO *et al.*, (2011) ont signalés que les polysaccharides hydrosolubles des truffes chinoises sont constituées de glucose, galactose et mannose.

Les constituants des polysaccharides de *Tuber melanosporum* dans les différentes stades de maturation identifiés par l'HPLC sont 59% de glucose qui est resté le principale sucre et 9,9% de mannose (HARKI *et al.*, 2006).

L'analyse de deux fractions polysaccharidiques de *Tuber indicum* révèle la présence de mannose, rhamnose, glucose et galactose avec des rapports molaires de 3,93, 1,24, 1,26 et 0,75, respectivement dans la fraction 1 de polysaccharides de *Tuber indicum*. Alors que, la fraction

2 polysaccharidiques est constituée de mannose, glucose et d'arabinose ayant des rapports molaires 5,27, 1,44 et 0.43 respectivement.

BOKHARY *et al.*, (1987) ont indiqué la présence de glycérol, glucose, fructose, mannitol, l'inositol et le tréhalose dans les extraits solubles de trois espèces du truffes *Tirmania nivea*, *Tirmania pinoyi* et *Terfezia boudieri* qui sont déterminés par la chromatographie en phase gazeuse dont l'inositol est absent chez *Terfezia boudieri*. Ils ont noté également que le sorbitol présente le composé majeur dans les trois espèces.

WU *et al.*, (2013) ont indiqué que les différences marqués en composition de sucre peuvent être liées aux différentes méthodes d'analyses et des échantillonnages. Aussi, les constituants des polysaccharides sont facilement oxydés par des procédés chimiques. Autrement dit que le temps et l'humidité peuvent affectés les résultats de caractérisation.

D'après les résultats obtenus précédemment, on suggère que notre polysaccharide est un glucane.

### **III.4.- Activités biologiques des polysaccharides**

#### **III.4.1.- Activités antioxydantes**

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles (POPOVICI *et al.*, 2009). Cet intérêt a mené au développement d'un grand nombre de tests pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, les capacités antioxydantes des extraits naturels (TELLI, 2009).

Jusqu'à présent aucune étude n'a été réalisée sur le pouvoir antioxydant des polysaccharides de *T. arenaria*. Dans cette étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait polysaccharidique de *T. arenaria* a été réalisée par deux techniques chimiques à savoir l'ABTS et DPPH, en utilisant le pourcentage d'inhibition des radicaux libres pour évaluer la capacité antioxydante.

Les résultats obtenus de l'activité antioxydante de *T. arenaria* sont représentés dans la figure 06 et la figure 07. Le pourcentage d'inhibition maximal de DPPH et d'ABTS en présence

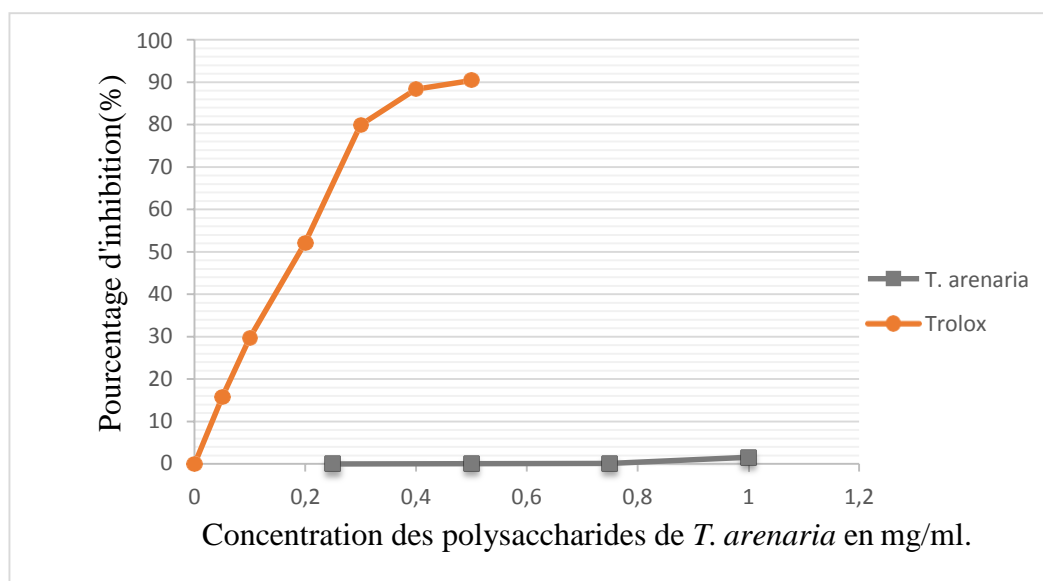


de polysaccharides de *T. arenaria* atteint 1,56% et 5,19% à 1mg/ml, respectivement. Cette teneur est très négligeable par rapport à polysaccharides de *Agaricus bisporus* soit 49,36% et 51,68% pour le test de DPPH et d'ABTS, respectivement (KHAN *et al.*, 2015).

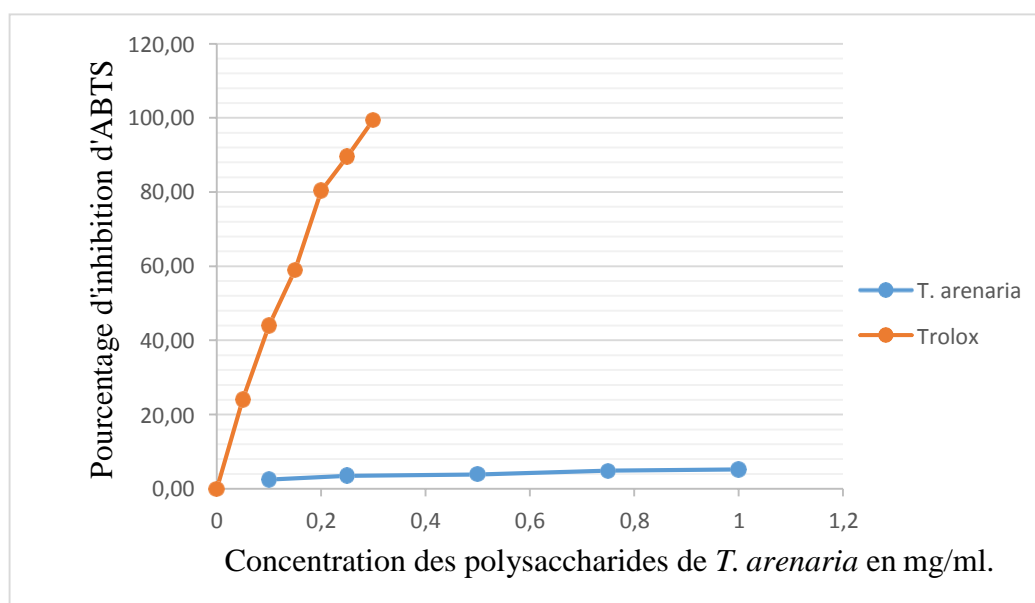
ZHANG *et al.* (2014) rapportent que les polysaccharides de *Pleurotus eryngii* ont une capacité inhibitrice, soit 48,7% à 1mg/ml, selon le test de DPPH. Tandis que, ALZORQ *et al.* (2016) annoncent que les polysaccharides isolés à partir de *Ganoderma lucidum* possèdent un pourcentage d'inhibition maximal de DPPH allant jusqu'à 55,44% à 75µg/ml. Ainsi, les polysaccharides de *Hohenbuehelia serotina* ont une activité antioxydante maximale soit 92,32% selon le test d'ABTS (LI et WANG, 2016).

En revanche, LUO *et al.* (2011) extraient deux fractions de polysaccharides hydrosolubles, TIP1-1 et TIP2-1, à partir de *Tuber indicum*. Ces polysaccharidiques TIP1-1 et TIP2-1 ont de poids moléculaire de  $1,75 \times 10^4$ Da et  $5,73 \times 10^3$ Da, respectivement. L'analyse de la composition monosaccharidique par chromatographie en phase gazeuse indique que TIP1-1 était composée de mannose, de glucose, de galactose et de rhamannose, tandis que TIP2-1 était composée de mannose, de glucose et de l'arabinose. Ces polysaccharides présentent une activité antiradicalaire dépendante de la concentration. Les valeurs IC<sub>50</sub> de TIP1-1 et TIP2-1 soit 1,74 et 1,39mg/ml, respectivement.

On remarque que dans les littératures, les polysaccharides issus des truffes ou bien des champignons comestibles ont des activités antioxydantes puissantes (LUO *et al.*, 2011 ; VAMANU, 2012 ; SUN, 2014). A cet effet on peut constater que l'activité antioxydante des polysaccharides peut être liée à l'espèce, le poids moléculaire, la composition monosaccharidique, et ainsi la technique d'extraction utilisée pour isoler les polysaccharides (WANG *et al.*, 2016).



**Figure 6.- Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des concentrations de *T. arenaria*.**



**Figure 7.- Pourcentage d'inhibition de radical libre ABTS en fonction des concentrations de *T. arenaria*.**

Pour mieux comprendre l'activité antioxydante des polysaccharides de *T. arenaria*, on est besoin d'une étude plus approfondie sur leur composition monosaccharidique et aussi les conditions d'extraction des polysaccharides.

### III.4.2.- Activité phagocytaire

La phagocytose représente l'une des plus importants mécanismes de défenses de l'hôte contre des agents pathogènes d'où elle est contrôlée par différents facteurs tels que les récepteurs de surface et les cytokines (MEHELLOU, 2015). En plus, Les polysaccharides sont considérant comme l'une des facteurs qui sont capables de stimuler simultanément les différentes composantes de système immunitaire (SANCHEZ, 2006) dont SHI et *al.* (2014) ont rapporté que les polysaccharides de *Ganoderma lucidum* stimulent la prolifération des macrophages et la production de NO.

Ce travail s'intéresse à l'étude de l'activité phagocytaire des cellules immunitaires issues de sang total sur les levures de *C. albicans*. Les polysaccharides hydrosolubles de *T. arenaria* sont testés, en considérant le zymosan comme contrôle positif.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage et sous forme des histogrammes dont la figure 08 présente la capacité phagocytaire et la figure 09 présente l'activité phagocytaire.

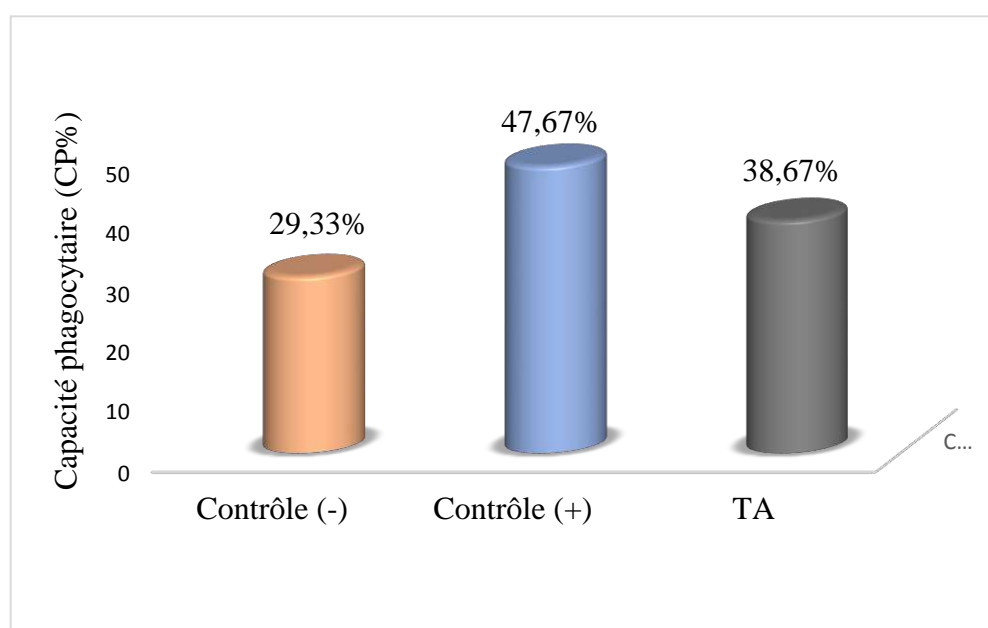
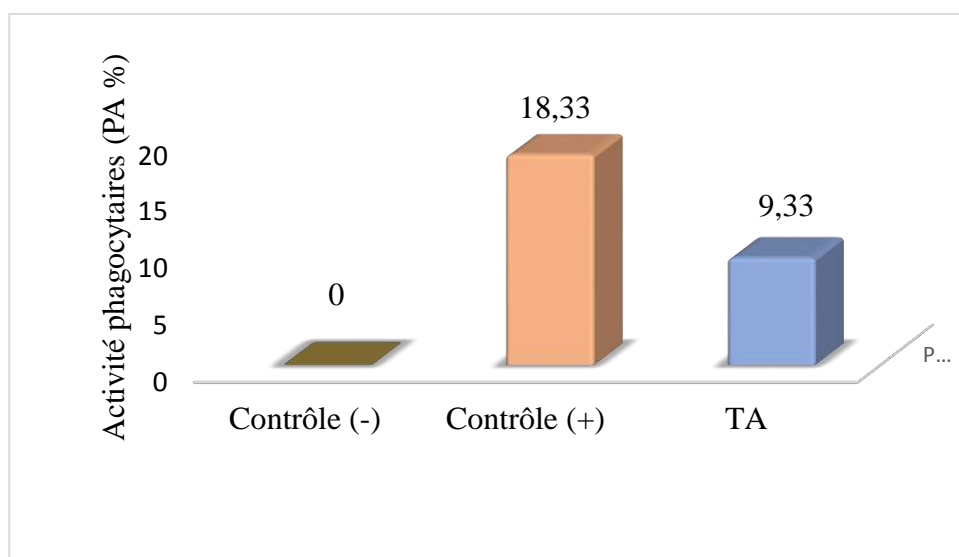


Figure 8.- Capacité phagocytaire de l'extrait polysaccharidique de *T. arenaria*.



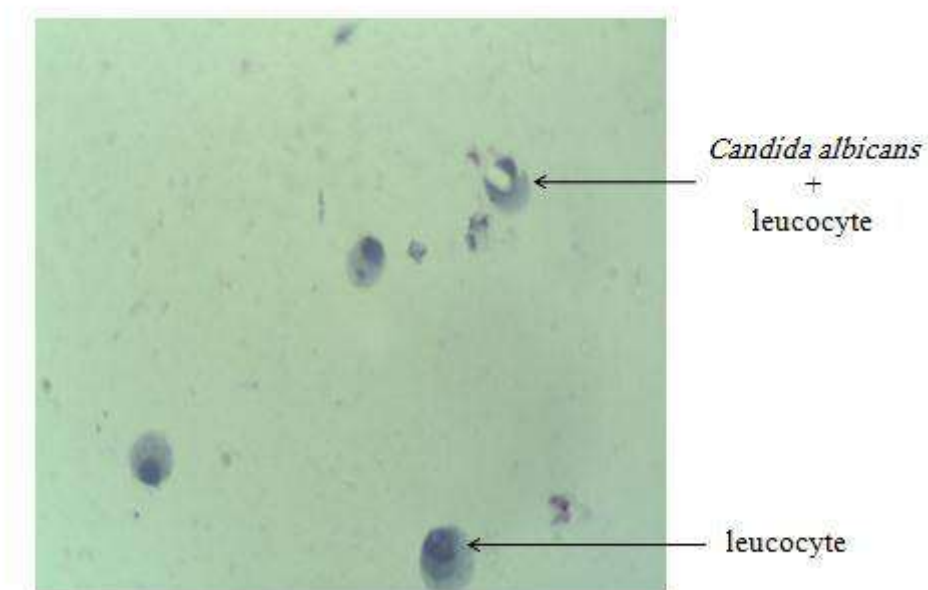
**Figure 9.-** Activité phagocytaire d'extrait de polysaccharides hydrosoluble de *T. arenaria*.

La figure 08 montre une capacité phagocytaire des leucocytes soit 38,67% pour l'extrait polysaccharidique de *T. arenaria*. La capacité phagocytaire de contrôle négatif est de 29,33%, semble inférieure à celle présentée par de SOUZA FERREIRA *et al.* (2016), soit 40% pour *Candida albicans*. Cependant que, le contrôle positif, zymosan, donne une capacité phagocytaire de 47,67%, semble inférieure à celle trouvée par de SOUZA FERREIRA *et al.* (2016), soit 60%. Ces différences des capacités phagocytaires semblent dues au temps d'incubation, soit 30 min, utilisé par de SOUZA FERREIRA *et al.* (2016). GIAIMIS *et al.* (1992) ont signalé une capacité phagocytaire de 22,5% pour *Saccharomyces cerevisiae*.

En outre, le zymosan a montré une activité phagocytaire de 18,33%. De même, l'activité phagocytaire de l'extrait polysaccharidique est de 9,33%, semble inférieure à celle de zymosan. ZHAO *et al.* (2012) ont indiqué une activité phagocytaire de 52,69% à une concentration polysaccharidique de 200mg/Kg, 32,81% pour une concentration de 100mg/kg et 20,88% pour une concentration de 50mg/kg chez *Tuber sinense*. SHI *et al.* (2014) ont signalés que l'activité phagocytaire des macrophages RAW 264.7 est augmentée significativement par les polysaccharides de *Ganoderma lucidum* d'une manière dose-dépendante.

ZHENG *et al.* (2005) ont confirmé que la fraction polysaccharidique 2 qui est isolée et purifiée à partir de l'organe de fructification de *Lentinus edodes* et qui est constituée d'un D-

glucane a la capacité d'augmenter la phagocytose des macrophages de souris porteuses de tumeurs.



**Photo 2.- Observation microscopique de la phagocytose de *Candida albicans* en présence de polysaccharide de *T. arenaria* (x 1000) (Photo originale).**

### III.3.3.- Activité antidiabétique

Les  $\alpha$ -glucosidases (EC 3.2.1.20) sont des enzymes contenues dans la salive, le suc pancréatique et les cellules de l'intestin grêle. Elles hydrolysent les glucides alimentaires pour leur permettre d'être absorbés sous forme mono-saccharidiques, qui seuls peuvent franchir la barrière intestinale (YOSHIKAWA *et al.*, 2010). Les inhibiteurs de ces enzymes ralentissent le clivage enzymatique des sucres alimentaires. L'absorption du glucose après un repas est ainsi retardée dans le temps chez les patients diabétiques (MEDJDOUB, 2013). Dans ce fait, l'acarbose est connu comme un inhibiteur de  $\alpha$ -glucosidase et il est proposé comme un traitement pour le diabète sucré de type 2 (FATMAWATI *et al.*, 2013). Cependant, ce médicament a des effets secondaires tels que la production des gaz, le ballonnement et la diarrhée (KEBIECHE, 2009).

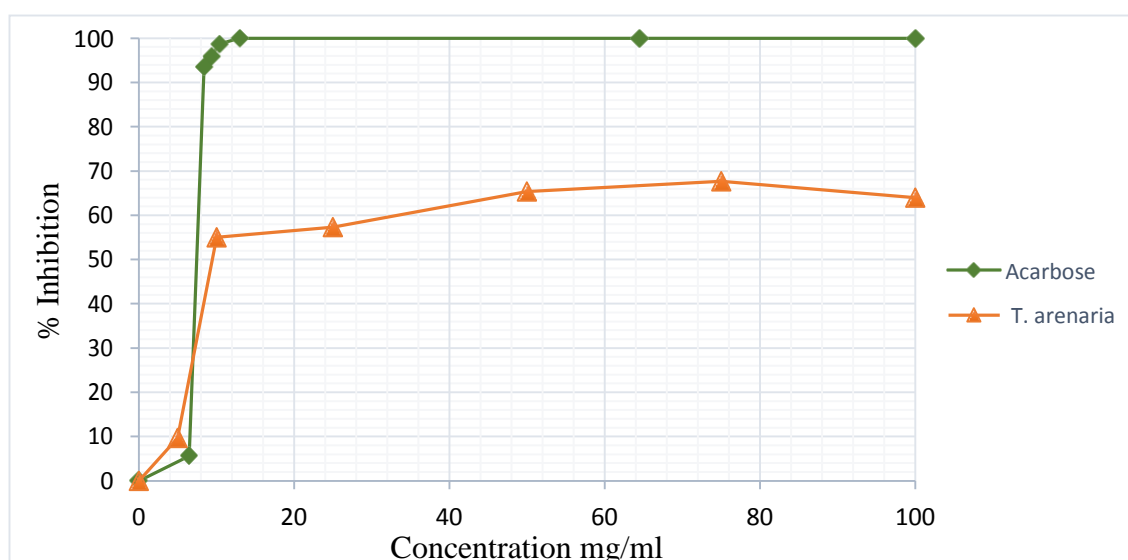
Dans ce travail, nous avons étudié l'activité inhibitrice de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase par les polysaccharides de *T. arenaria*, en considérant l'acarbose comme un contrôle positif.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentages de l'inhibition de  $\alpha$ -glucosidase. Différentes concentrations d'acarbose et de l'extrait polysaccharidique de *T. arenaria* ont été testées. Les résultats sont consignés dans la figure 10.

L'allure des graphes des suivis d'inhibition de l'activité enzymatique montre des courbes hyperboles.

En effet, l'acarbose a montré une inhibition maximale à partir de 0,06 mg/ml jusqu'à 64,56mg/ml. A 0,006mg/ml aucune inhibition n'a été remarquée. BISHT *et al.* (2013) annoncent un pourcentage d'inhibition maximal inférieur, soit 74,88% à 5,16mg, par rapport à cette étude. Cependant, WANG *et al.* (2010) rapportent une activité maximale (100%) à une concentration de 5mg/ml.

En revanche, l'extrait polysaccharidique de *T. arenaria* a montré une inhibition appréciable. Le suivi d'inhibition à différentes concentrations montre une augmentation d'inhibition exponentielle allant de 9,7% jusqu'à 55% pour les concentrations de 5 mg/ml et 10 mg/ml, respectivement. A partir de la concentration de 10 mg/ml, il est remarqué une amélioration d'inhibition fluctuante allant de 55% jusqu'à 67,67%. Cette dernière correspond le pourcentage d'inhibition maximal de  $\alpha$ -glucosidase à une concentration de 75mg/ml. Ensuite, depuis cette valeur, la courbe devient un peu constante.



**Figure 10.-** Activité inhibitrice de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase par l'acarbose et les polysaccharides de *T. arenaria*.

ZHU *et al.* (2016) signalent que les polysaccharides d'*Astragalus sp* ont un effet d'inhibition de  $\alpha$ -glucosidase maximal, soit 49% à 1,5 mg/ml. Il est inférieur par rapport à celle de *T.arenaria*. Par contre, BISHT *et al.* (2013) a montré que les polysaccharides d'*Acacia tortilis* ont un pourcentage d'inhibition maximal de 76,77% à 5mg/ml, semble inférieur à celui des polysaccharides de *T. arenaria*.

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique de  $\alpha$ -glucosidase ( $IC_{50}$ ) sous l'effet de polysaccharides de *T. arenaria* est de 9,09%. Cette valeur semble supérieure à celle des polysaccharides d'*Astragalus sp* et d'*Acacia tortilis*, soit 0,28% et 0,5%, respectivement (BISHT *et al.*, 2013 ; ZHU *et al.*,2014). De même, les fractions polysaccharidiques de *Coriolus versicolor*, iPL-F5-5-1, iPL-F5-4-1 et iPL-F5-2-1, soit 0,8, 1,7 et 1,8, respectivement (HSU *et al.*, 2013).

Néanmoins, QIAN *et al.* (2015) annoncent une  $IC_{50}$  supérieure, de 13.70mg/ml et 22.49mg/ml chez les fractions polysaccharidiques de *Hordeum vulgare L*, soit SBP-2 et SBP-1 respectivement, à celle des polysaccharides de *T. arenaria*.

Hsu *et al.* (2013) ont montré qu'il n'y a aucune relation entre les composants chimiques des polysaccharides et l'activité inhibitrice de  $\alpha$  -glucosidase. Cette observation a conduit que l'effet inhibiteur de l'enzyme peut être dépend à la structure du polysaccharide.

# *Conclusion*

---



*Terfezia arenaria*, est une truffe désertique possédant des propriétés thérapeutiques importantes. L'analyse physico-chimique de *Terfezia arenaria* a montrée des faibles teneurs en cendre, Sodium, Potassium, polyphénols totaux et acides gras à courte chaînes. Alors que, des teneurs acceptables ont été trouvés en flavonoïdes et en lipide.

La deuxième étape est portée sur l'étude de constituants en protéines, oses totaux, oses neutres et acides de l'extrait polysaccharidique de *Terfezia arenaria* dont les oses neutres présentent les composés majeurs de *T. arenaria*.

La troisième étape comporte la caractérisation des oses constitutifs de l'extrait méthanolique et de polysaccharides par CCM en utilisant quatre systèmes. L'analyse a montré la présence de glucose en dominance, l'acide D-galacturonique, l'acides D-glucuronique et le mélibiose dans l'extrait polysaccharidique et uniquement le tréhalose dans l'extrait méthanoliques. Ces résultats nous ont permis de suggérer que le polysaccharide obtenu est un glucane.

La quatrième étape consiste à l'étude de certaines activités biologiques, phagocytaires, antioxydante et antidiabétiques de l'extrait polysaccharidiques de *Terfezia arenaria* d'où les polysaccharides de ce dernier présentent une activité antioxydante assez faible, par contre la mesure de l'activité antidiabétique montre une activité inhibitrice puissante de l'enzyme de l' $\alpha$ -glucosidase.

Le test phagocytaire nous a permis de remarquer que l'extrait polysaccharidique de *Terfezia arenaria* présente la capacité de stimuler l'activité phagocytaire ce qui est signifié leur utilisation dans la médecine traditionnelle.

### **Perspective**

Pour une bonne caractérisation de compositions en oses constitutifs de l'extrait polysaccharidique de *Terfezia arenaria*, on suggère l'utilisation d'autres méthodes telles que HPLC et la chromatographie en phase gazeux.

Il est souhaitable d'exploité d'autre méthodes telle que la cytométrie en flux et RMN afin d'identifier d'autre propriétés biologiques de polysaccharide de *Terfezia arenaria* pour donner avec précision le/les mécanisme(s) moléculaire(s) responsable(s) de ces effets.

# *Références*

---

*bibliographiques*

ABDUL MAJID A. M. S., DAHHAM S. S., AL-RAWI S. S., IBRAHIM A. H et ABDUL MAJID A. S., 2016- Antioxidant, anticancer, apoptosis properties and chemical composition of black truffle *Terfezia clavaryi*. Saudi Journal of Biological Sciences.

ABID S., KHAJURIA A., PARAVAIZ Q., SIDIQ T., BHATIA A., SINGH S., AHMAD S., RANDHAWA M.K., SATTI N.K., et DUTT P., 2012.- Immunomodulatory studies of a bioactive fraction from the fruit of *Prunus cerasus* in BALB/c mice. International Immunopharmacology, vol. 12: 626-634.

AFNOR., 1982.- Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits. Ed. AFNOR.

AFSHARI K., SAMAVATI V. et SHAHIDI S. A., 2015- Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from Hibiscus leaf. International Journal of Biological Macromolecules, vol.74: 558–567.

AGARWAL S.S. et SING V. K., 1999- Immunomodulators: A Review of Studies on Indian Medicinal Plants and Synthetic Peptid. Pinsa, vol. 65:179-204.

AI L., WUA J., CHEC N., WUA Y., Cui S.W., 2012.-Extraction, partial characterization and bioactivity of polysaccharides from boat-fruited *sterculia* seeds. International journal of biological macromolecules, vol.51:815– 818.

AKYÜZ M., 2013.- Nutritive value, flavonoid content and radical scavenging activity of the truffle (*Terfezia boudieri* Chatin). Journal of Soil Science and Plant Nutrition, vol. 13: 143-151.

Al-Alawi N.A. M., 2009. Food Habits Related With Feeding the Truffle Fangs and Effect of Some of Their Treatments on Experimental Rats. Thèse Master, College of Education for Home Economics, Makkah Al Mukarramah. Arabie Saoudite, 64-66p.

Al-Laith A.A .A., 2010.- Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. Journal of Food Composition and Analysis, vol .23 : 15–22.

Al-Rahmah A.N., 2001.- La truffe du désert et les forêts. King Saud University. Publications. (En Arabe) p 258.

AL-SHABIBI M.M.A., TOMA S.J., et HADDAD B.A., 1982.- Studies on Iraqi truffles. Proximate

analysis and characterization of lipids. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, vol. 15: 200-202.

ALZORQI I., SUDHEER S., LU T.J., MANICKAM S., 2016.- Ultrasonically extracted b-D-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. Ultrasonics Sonochemistry.

AOAC., 2000.- Official Methods of Analysis International. 17<sup>ème</sup> Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

ATLAS R. M., 2010.-Handbook of Microbiological Media, 4<sup>ème</sup> Edition. Ed. CRC Press, USA: 831p.

ATTOU A., 2011.- Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister, université de Tlemcen, Algérie : 41p.

AUDIGIE C., DUPONT G., ZONZAIN F., 1983.- Principes des méthodes d'analyse biochimique, 2<sup>ème</sup> Edition. Doin éditeurs, Paris. 33p.

AUDIGIE C., DUPONT G., ZONZAIN F., 1995.-Principe des méthodes d'analyse biochimique, 2<sup>ème</sup> Edition. Ed. Biosciences et Technique, Paris. 44-56p.

BAHORUN T., GRESSIER B., TROTIN F., BRUNETE C., DINE T., VASSEUR J., GAZIN J.C., PINKAS M., LUYCKY M., GAZIN M., 1996.-Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim Forsch*, vol. 46: 1086-1089.

BALLESTEROS L.F., CERQUEIRA M.A., TEIXEIRA J.A et MUSSATTO S.I., 2015.- Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. *Carbohydrate Polymers*, vol. 127:347–354.

BANGOOD S., 1984.- Chemical composition of major date cultivars grown in the United Arab Emirates, *Date palm journal*, vol. 3: 381-394.

BARBAT L, 2009.- Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylanes de bois de châtaignier. Développement de nouveaux procédés de délignification. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, France : 45p.

BARREIRA JOÃO C.M., FERREIRA ISABEL C.F.R., OLIVEIRA M. BEATRIZ P.P.,

- PEREIRA JOSE A., 2008.- Antioxidant activity and bioactive compounds of ten Portuguese regional and commercial almond cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46: 2230–2235.
- BEARA I.N., LESJAK M.M., ETOJEVIC-SIMIN D.D.C., MARJANOVIC Z.S., RISTIC J.D., MRKONJIC Z.O et MIMICA-DUKIC N.M., 2014.- Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of black (*Tuber aestivum* Vittad.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Food Chemistry*, vol. 165: 460–466.
- BEDDOU F., 2015.- Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de Doctorat d'Université de Tlemcen, Algérie.60p.
- BENHAMMOU N., BEKKARA F.A., PANOVSKA T.K., 2009.- Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compound of *Atriplex halimus*. *R.C.CHIMIE*, vol. 12: 1259-1266.
- BIGLARI F., ALKARKHI A. F.M., et EASA A. M., 2008.- Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, vol. 107:1636-1641.
- BISHT S., KANT R et KUMAR V., 2013.-  $\alpha$ -d-Glucosidase inhibitory activity of polysaccharide isolated from *Acacia tortilis* gum exudate. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 59: 214–220.
- BLUMENKRANTZ N., et ASBOE-HANSEN G., 1973.- New Method for Quantitative Determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, Vol. 54: 484- 489.
- BOA E. R., 2004.- Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. *Food & Agriculture Org*, No.17.
- BOIZOT N., CHARPENTIER.J.P., 2006.-Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. 79-82 p.
- BOKHARY H.A et PARVEZ S., 1987- Chemical Composition of Desert Truffles *Terfezia clavaryi*. *Journal of Food composition and analysis*, vol. 6: 285-293.
- BOKHARY H.A., SULEIMAN A.A.A., BASALAH M.O., PARVEZ S., 1987.- Chemical Composition of Desert Truffles from Saudi Arabia. *Food Sci. Technol*, vol. 20:336-341.

BOUAL Z., 2009- Contribution à l'étude des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérien). Thèse en vue d'obtention de grade Magister, université d'Ouargla : p34.

BOUAL Z., 2014- Caractérisation physico-chimique des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara Septentrional Est algérien): Activité biologique. Thèse en vue d'obtention de grade Doctorat, université d'Ouargla, 219p.

BOUAL Z., CHOUANA T., KEMASSI A., HAMID OUDJANA A., DADDI BOUHOUN M., MICHAUD P., OULD EL HADJ M.D., 2015.-Étude physicochimique et biologique des polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae). *Phytothérapie*, vol. 13: 396-402.

BOUAL Z., KEMASSI A., HAMID OUDJANA A., MICHAUD P, et OULD EL HADJ M. D., 2013b.- Caractérisation physico-chimique et biochimique des bulbes d'*Urginea noctiflora* (Liliaceae) récoltée dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie): Activités antioxydantes et antimicrobiennes. *Phyto Chem& Bio Sub Journal*, vol. 7 (2) : 2170-1768.

BOUAL Z., KEMASSI A., HAMID OUDJANA A., MICHAUD P. et OULD EL HADJ M. D., 2013a- Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* L. (malvaceae): activité prébiotique. *Lebanese Science Journal*, vol.14: 2.

BOUAL Z., KEMASSI A., MICHAUD P et OULD EL HADJ M. D., 2011.- Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Asphodelus tenuifolius* L. (liliaceae): effet prébiotique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides. *Algerien journal of arid environment*, vol. 1: 52- 60.

BOUAL Z., PIERRE G., DELATTRE C., BENAOUN F., PETIT E., GARDARIN C., MICHAUD P. et OULD EL HADJ M. D., 2015- Mediterranean semi-arid plant *Astragalus armatus* as a source of bioactive galactomannan. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, vol. 5: 10–18.

BOUHADJERA K., 2005.- Contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Thèse de l'Université Abou Bekr Belkaid-Télemcen, Algérie: 2p.

BRADAI I., 2014- inventaire et bioécologie des terfez dans quelques régions du Sahara

septentrional (Oued M'ya, Oued Righ et Ghardaïa). Thèse en vue d'obtention de grade Doctorat, université d'Ouargla, 124p.

BRADAI L., BISSATI S., CHENCHOUNI H., 2014.- Desert truffles of the North Algerian Sahara : Diversity and bioecology. Emir .J. Food Agric, 26: 425-435.

BRADAI L., NEFFAR S., AMRANI K., BISSATI S. ET CHENCHOUNI H., 2015- Ethnomycological survey of traditional usage and indigenous knowledge on desert truffles among the native Sahara Desert people of Algeria. Journal of Ethnopharmacology, vol.162: 31–38.

BRADFORD M. M., 1976. - A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry, vol. 72: 248-254.

BRUDIEUX V., 2007.- Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermocosmétique. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, France : 194p.

BURNAT B., WALKOWIAK-PRZYBYŁO M., BŁASZCZYK T., et KLIMEK L., 2013.- Corrosion behaviour of polished and sandblasted titanium alloys in PBS solution, vol.15 (1): 87-95.

CAI W., XU H., XIE L., SUN J., SUN T., WU X. et FU Q., 2016- Purification, characterization and in vitro anticoagulant activity of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge roots. Carbohydrate Polymers, vol.140: 308–313.

CHEBREGZABEIER M., RUFTNT S., MONALDI B., LATO M., 1976.- Thin- layer chromatography of carbohydrates. Journal of chromatography, vol. 127:133- 162.

CHEN R., LI H., LI S., JIN C., LU J., 2015.- Extraction optimization, preliminary characterization and immunological activity of polysaccharides from figs. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 72: 185–194.

CHENA M. L., WU S., TSAI T. C., WANG L. K., et TSAI F. M., 2014.- Regulation of neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli* by antipsychotic drug. International Immunopharmacology, vol. 23: 550-557.

CHENG Y., JIA G., JIANG-SHENG Z., et SHAO-PING L., 2010.- Use of HPTLC to

Differentiate Among the Crude Polysaccharides in Six Traditional Chinese Medicines. *Journal of Planar Chromatography*, vol 23: 46-49.

CHEUNG L.M., CHEUNG P.C.K., OOI V.E.C., 2003.- Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem*, vol. 81: 249- 255.

CHEVALIER, G., 2014.- *The European Desert Truffles*. Springer Berlin Heidelberg. Pp 121-141.

COLLIN P., 2001- *L'adaptation au milieu chez les plantes vasculaires*. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, vol.40 : 21-42.

COSTA R., FANALI C., PENNAZZA G., TEDONE L., DUGO L., SANTONICO M., SCIARRONE D., CACCIOLA F., CUCCHIARINI L., DACHA M. et MONDELLO L., 2014- Screening of volatile compound composition of white truffle during storage by GCxGC-(FID/MS) and gas sensor array analyses. *LWT - Food Science and Technology*, vol : 1-9.

CUI J. et CHISTI Y., 2003- Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, vol.21: 109– 122.

CZUPRYNSKI C. J., NOEL E. J., et ADLAM C., 1991.- Interaction of bovine alveolar macrophages with *Pasteurella haemolytica*A1 in vitro: modulation by purified capsular polysaccharide. *Veterinary microbiology*, vol. 26: 349-358.

DALMAU A., GUIÑÓN PINA V., DEVESA F., AMIGÓ V., et IGUAL MUÑOZ A., 2015.- Electrochemical behavior of near-beta titanium biomedical alloys in phosphate buffer saline solution. *Materials Science and Engineering*, vol. 48: 55-62.

DAVID J. H et HAZEL P., 1998.- *Analytical biochemistry*, 3ème Edition. Ed. Prentice Hall, Angleterre : 336.

DE SILVA D. D., RAPIOR S., SUDARMAN E., STADLER M., XU J., ALIAS S. A., et HYDE K. D., 2013.- Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, vol.62:1- 40.

DE SOUZA FERREIRA C., PENNACCHI P. C., ARAUJO T. H., TANIWAKI N. N., DE ARAUJO PAULA F. B., DA SILVEIRA DUARTE S. M. ET RODRIGUES R., 2016.- Amino-guanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats : Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils. *European Journal of Pharmacology*, vol.772: 83–91.



DELATTRE C., 2005.- Strategie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par degradation enzymatique de glucuronanes. Thèse doctorat de l'universite de Picardie Jules Verne, Amiens : 52-83p.

DENG J., SHI Z. J., LI X. Z. et LIU H. M., 2013.- soluble polysaccharides isolation and characterization from Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) Fruits. *Bio Resources*, vol.8:405-419.

DENNOUNI N., 1996.- Mise en évidence des activités antibactériennes et Antifongiques chez deux espèces de Terfez d'Algérie (*Tirmania nivea* et *Tirmania pinoyi*). Thèse en vue d'obtention de grade Magister, université d'Tlemcen, 115p.

DETERS A. M., LENGSELD CH., HENSEL A., 2005.- Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 102: 391–399.

DIALLO D., SANOGO R., YASAMBOU H., TRAORE A., COULIBALY, K et MAIGA, A. 2004. Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam.(Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Chimie*, 7: 1073–1080.

DING X., TANG J., CAO M., GUO C. X., ZHANG X., ZHONG J., ZHANG J., SUN Q., FENG S., YANG Z.R., ZHAO J., 2010.-Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Tricholoma matsutake*. *Int J Biol Macromol*, vol.47:271–275.

DJERIDANE A., YOUSFI M., NADJEMI B., BOUTASSOUNA D., STOCKER P., VIDAL N., 2006.-Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, vol. 97: 654–660.

DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., PEBERS P. A., et SMITH F., 6591.- Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, vol. 28: 350-356.

EDVARD C. I. S., HAMMARSTROM L. L. G., et PERSSON U. C. I., 1978- Macrophage Dependence of Mitogen Responsiveness: Macrophages Exposed to Zymosan Enhance the Response to Polyanions. *Cellular Immunology*, vol: 41 (1): 134- 149.

EL ENSHASY H. A. et HATTI-KAUL R., 2013.- Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*, Vol. 31: 12.

- EL-KIRAT-CHATEL S., 2010.- Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions *Candida* – phagocytes ; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez *C. lusitaniae*. Thèse Doctorat De l'Université Victor Segalen-Bordeaux 2, France: 168p.
- ENNEB H., BELKADHI A., CHEOUR F. et FERCHICHI A., 2015.- Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of new science*, vol. 20 :2.
- FATMAWATI S., KONDO R et SHIMIZU K., 2013.- Structure-activity relationships of lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lingzhi* as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol.13 : 812-8581.
- FERREIRA C. F. R. I., VAZ A. J., VASCONCELOS M. H. ET MARTINS A., 2010.- Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, vol.10: 424-436.
- FORTAS Z., CHEVALIER G., 1992.- Effet des conditions de culture sur la mycorhization de l'*Helianthemum guttatum* par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. *Can J Bot*, vol. 70:2453–2460.
- GENESTIE B., 2006.- Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales : Approches méthodologiques. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, France : 73-74p.
- GHONEUM M., et GOLLAPUDI S., 2004.- Phagocytosis of *Candida albicans* by metastatic and non-metastatic human breast cancer cell lines in vitro. *Cancer Detection and Prevention* 28:17-26.
- GIAIMIS J., LOMBARD Y., MAKAYA-KUMBA M., FONTENEAU P. et POINDRON P., 1992.- A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. *Journal of Immunological Methods*, vol. 154:185-193
- GIFFARD P. L., 1975.- Les gommiers, essences de reboisement pour les régions sahéliennes. *Bois et forêts des tropiques*, vol. 161: 3-21.
- GINER-CHAVEZ B.I., 1996.- Condensed tannins in tropical forages. Ph.D Thesis, Cornell University, Ithaca, NY, USA.

GOETHEM E. V., 2010- Caractérisation de la migration trans-matricielle des phagocytes humains. Thèse en vue d'obtention de grade DOCTORAT, université de Toulouse : 326P.

GOUZI H., DEPAGNE C., BENMANSOUR A., CORADIN T., 2013.- First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. Eur Food Res Technol, vol. 237:721–729.

GUILLAMON E., GARCIA-LAFUENTE A., LOZANO M., ROSTAGNO M. A., VILLARES A. et MARTINEZ J. A., 2010.- Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. Fitoterapia, vol. 81:715-723.

GUIÑÓN PINA V., DALMAU A., DEVESA F., AMIGÓ V et IGUAL MUÑOZ A., 2015.- Tribocorrosion behavior of beta titanium biomedical alloys in phosphate buffer saline solution. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, vol. 46:59- 68.

HAINQUE B., BAUDIN B., LEFEBVRE P., 2008.-Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Médecine-Science Flammarion, Paris.122-221p.

HAMZA A, ZOUARI N, ZOUARI S, JDIR H, ZAIDI S, GTARI M, NEFFATI M., 2013.- Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *Terfezia boudieri* Chatin, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone. Arabian Journal of Chemistry, vol.1878-5352.

HANKS J. H. 1975.- Hanks' balanced salt solution and ph control. Tissue culture association: 3-4.

HARKI E., BOUYA D., DARGENT R., 2006- Maturation-associated alterations of the biochemical characteristics of the black truffle *Tuber melanosporum* Vitt. Food Chemistry, vol. 99: 394–400.

HARUN N. H., SEPTAMA A. W., et JANTAN I., 2015.- Immunomodulatory effects of selected Malaysian plants on the CD18/11a expression and phagocytosis activities of leukocytes. Asian Pac J Trop Biomed, vol. 5: 48-53.

HEAKAL F. E., SHEHATA O.S., et TANTAWY N.S., 2014.- Degradation behaviour of AZ80E magnesium alloy exposed to phosphate buffer saline medium. Corrosion Science, vol. 86: 285-294 .

HEDJAL-CHEBHEB M., 2014.- Identification des principes actifs des huiles essentielles de quelques résineux et plantes aromatiques de provenance Algérienne et Tunisienne. Etude de leurs

activités biologiques à l'égard d'un insecte ravageur des graines stockées, *Callosobruchus maculatus* F. 1775 (Coleoptera : Bruchidae). Thèse de Doctorat de l'Université De Mouloud Mammeri-Tizi Ouzou, Algerie : 18p.

HOTON-DORGE M., 1976.- Séparation des aldoses et des polysaccharides par chromatographie sur couche mince de cellulose et nouveau réactif de pulvérisation permettant leur révélation sensible. *Chromatography*, vol. 116: 417-423.

HSU W. K., HSU T. H., LIN F. Y., CHENG Y. K et YANG J. P., 2013. -Separation, purification, and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of polysaccharides from *Coriolus versicolor* LH1 mycelia. *Carbohydrate Polymers*, vol. 92: 297–306.

HUSSAN G. et AL-RUQAIE I.M., 1999- Occurrence in chemical composition, and nutritional value of truffles: overview. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol.2: 510–514.

IGUERGAZIZ N., 2012.- Essai d'élaboration d'un alicament sous forme de comprimés de dattes entières et/ou dé-sucrées additionnés d'extrait aqueux des feuilles d'olivier algérien. Mémoire de Magistère de l'Université de Boumerdès, Algérie : 34 p.

ISRILIDES C., KLETAS D., ARAPOGLOU D., PHILIPPOUSSIS A., PRATSINIS H., Ebringerová A et Harding S. E., 2008.- In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine*, vol.15:512-519.

JAHANBIN K., MOINI S., GOHARI A. R., EMAM-DJOMEH Z. et MASI P., 2012.- Isolation, purification and characterization of a new gum from *Acanthophyllum bracteatum* roots. *Food hydrocolloids*, vol. 27:14-21.

JIANG P., YUAN L., CAI D., JIAO L., et ZHANG L., 2015.- Characterization and antioxidant activities of the polysaccharides from mycelium of *Phellinus pini* and culture medium. *Carbohydrate Polymers*, vol. 117: 600-604.

KAGAN-ZUR V., ROTH-BEJERANO N., 2008.- Desert truffles. *Truffles*, p1.

KAGAN-ZUR V., ROTH-BEJERANO N., SITRIT Y. et MORTE A. 2013.- Desert truffles: phylogeny, physiology, distribution and domestication. Springer Science & Business Media, Vol. 38.

KEBIECHE M., 2009.- Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de

Doctorat de l'Université Constantine, Algérie. 12 p.

KERMANI I., 2013.- Mycorhization contrôle d'une Cistacée pérenne par les terfez en conditions gnotoxéniques et essai de transplantation sur le terrain. Thèse en vue d'obtention de grade Magister, université d'Oran, 115p.

KHABAR, L., 2014.- Mediterranean Basin : North Africa. Springer Berlin Heidelberg.

KHAN A.A., GANI A., SHAH A., MASOODI F.A., HUSSAIN P.R., WANI I.A et KHANDAY F.A., 2015.- Effect of  $\gamma$ -irradiation on structural, functional and antioxidant properties of  $\beta$ -glucan extracted from button mushroom (*Agaricus bisporus*). Innovative Food Science and Emerging Technologies, vol. 31: 123–130.

KHANAQA A., 2006- Truffle production in the Kingdom of Saudi Arabia – potential and limitation. Journal of Applied Botany and Food Quality, vol.80: 14 – 18.

KOKO W.S., MESAİK M. A., YOUSAF S., GALAL M., et CHOUDHARY M. I., 2008.- In vitro immunomodulating properties of selected Sudanese medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 118: 26-34.

Kruzelyi D et Vetter J., 2014.- Complex chemical evaluation of the summer truffle (*Tuber aestivum* Vittadini) fruit bodies. Journal of Applied Botany and Food Quality, vol. 87: 291 - 295.

KUKA M et CAKSTE I., 2011.- BIOACTIVE COMPOUNDS IN LATVIAN WILD EDIBLE MUSHROOM BOLETUS EDULIS. FOODBALT, vol. 301: 116-120.

LAGANE C., 2007- Rôle de l'IL-13 des ligands de PPAR-  $\gamma$  dans la réponse anti- infectieuse des macrophages murines et des monocytes humain vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de PPAR- $\gamma$ .

LAMAISON J.L.C. et CARNET A., 1990.- Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* en fonction de la végétation. Pharmaceutical Acta. Vol. 65 : 315-320.

LAOUINI S., 2014.- Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). Thèse de Doctorat de l'Université Biskra, Algérie. 130p.

LEFKOWITZ S. S, GELDERMAN M. P., LEFKOWITZ D. L., MOGUILEVSKY et BOLLEN A., 1995.- Phagocytosis and Intracellular Killing of *Candida albicans* by Macrophages Exposed to

Myeloperoxidase. *The Journal of Infectious Diseases*, vol.173.

LI S. et SHAH N. P., 2015.- Effects of *Pleurotus eryngii* polysaccharides on bacterial growth, texture properties, proteolytic capacity, and angiotensin-I-converting enzyme–inhibitory activities of fermented milk. *Journal of dairy science*, vol. 98: 2949-2961.

LI S.P., ZHANG G.H., ZENG Q., HUANG Z.G., WANG Y.T et DONG T.T.X., 2006.- Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine*, vol. 13 : 428–433.

LI X., WANG L., 2016.-effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 83: 270–276.

LI Y.Q., FANG L., ZHANG K.C., 2007.-Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr Polym*, vol.68:323–328.

LIU R S., LI D.S., LI H. M et TANG Y. J., 2008- Response surface modeling the significance of nitrogen source on the cell growth and Tuber polysaccharides production by submerged cultivation of Chinese truffle *Tuber sinense*. *Process Biochemistry*, vol.43:868–876.

LOIZIDES M., HOBART C., KONSTANDINIDES G., YIANGOU Y., 2011.- Desert truffles: The mysterious jewels of antiquity, vol. 13: 1.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH J N., FARR L A. et RANDALL R J., 1951.- Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, vol. 193:265-275.

LUO A., HE X., ZHOU S., FAN Y., LUO A et CHUN Z., 2010.-Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobiunobile*Lindl. *Carbohydrate Polymers*, vol. 79: 1014–1019.

LUO Q., ZHANG J., YAN L., TANG Y., DING X., YANG Z. et SUN Q., 2011- Composition and Antioxidant Activity of Water-Soluble Polysaccharides from *Tuber indicum*. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*, vol.12: 1609–1616.

MAQBOOL M., VIDYADARAN S., GEORGE E., et RAMASAMY R., 2011.- Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. *Med J Malaysia*,

vol. 66 (4): 296-299.

MEDJDOUB H., 2013.- Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de *Zygothellium geslini* Coss. Thèse de Doctorat de l'Université de Tlemcen, Algérie : 47p.

MEHELLOU Z., 2015.- Caractérisation partielle et activités biologiques des polysaccharides hydrosolubles issus de deux plantes spontanées récoltées au Sahara septentrional Est algérien. Thèse en vue d'obtention de grade Magister, p170.

MERCK K., 2008.- May-Grünwald en solution d'éosine-bleu de méthylène. Dispositivemedical de diagnostic in vitro. Allemagne.

MIAO Y. Z., LIN Q., CAO Y., HE G. H., QIAO D. R. et CAO Y., 2011.- Extraction of water-soluble polysaccharides (WSPS) from Chinese truffle and its application in frozen yogurt. Carbohydrate Polymers, vol.86: 566– 573.

MIRAMON P., DUNKER C., WINDECKER H., BOHOVYCH I. M., BROWN A. J. P., KURZAI O. ET HUBE B., 2012- Cellular Responses of *Candida albicans* to Phagocytosis and the Extracellular Activities of Neutrophils Are Critical to Counteract Carbohydrate Starvation, Oxidative and Nitrosative Stress. PLOS ONE, vol.7.

MOINFAR F., SPIELER P. et RÖSSLE R.,2012.- Nongynecologic Cytopathology: A Practical Guide. Ed. Springer Science & Business Media, London: 177p.

MONSIGNY M., CLAIRE P. et ROCHE A., 1988.- Calorimetric Determination of Neutral Sugars by a Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod. Analytical Biochemistry, 175: 525-530.

MORADALI M.F., MOSTAFAVI H., GHODS S., HEDJAROUDE G.A.,2007.- Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). International immunopharmacol, vol. 7:701–24.

MOSIHUZZMAN M., NAHEED S., HAREEM S., TALIB S., ABBAS G., et ISRAR M., 2013.- Studies on  $\alpha$ -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis*. Life Sciences, vol. 92: 187–192.

MUANDA F.N., DICKO A., et SOULIMANI R., 2010.- Assessment of polyphenolic compounds, in vitro antioxidant and anti-inflammation properties of *Securidaca longepedunculata* root barks. Comptes Rendus Biologies, vol. 333: 663–669.

MURAT-FURMINIEUX C., 2004.- Etude de la diversité génétique de la truffe blanche de Piémont (*Tuber magnatum* Pico) et de la truffe noire de Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.). Thèse en vue d'obtention de grade Doctorat, université d'Henri Poincaré, Nancy-I, 158p.

MUSA K. H., ABDULLAH A., KUSWANDI B., HIDAYAT M. A., 2013.- A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. Food Chemistry, vol. 141: 4102-4106.

NADOUR M., 2015.-Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issus des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides à visée alimentaire. Thèse en vue d'obtention de grade Doctorat, université de Tizi- Ouzou, Algérie : 76-77p.

NAGARATHNA P. K. M., REENA K., SRIRAM R. et JOHNSON W., 2013- Review on Immunomodulation and Immunomodulatory Activity of Some Herbal Plants. International journal of pharmaceutical sciences review and research, vol.22: 223-230.

NAOUN N., 2014.- Influence du peroxyde d'hydrogene sur la susceptibilitea la corrosion des aciers inoxydables en milieu salin. Thèse de Doctorat de l'Université Hadj Lakhdar-Batna, Algerie: 44p.

NERGARD C S., DIALLO D., INNGJERDINGEN K., MICHAELSEN T E., MATSUMOTO T., KIYOHARA H., YAMADA H., et PAULSEN B S., 2005.- Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* Mali Anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. Journal of Ethnopharmacology 96, vol: 255-269.

NIU Y., WANG H., XIE Z., WHEAT M., GAO X., ZHANG X., ZOU S., YAO W., YU L., 2011.- Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. Var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao. Food Chemistry, vol. 128: 620–626.

NORUM M., BOGWALD J., et DALMO R. A., 2005.-Isolation and characterisation of spotted wolfish (*Anarhichas minor*Olafsen) macrophages, vol. 18: 381-391.

NOSE M., TERAWAKI K. et OGIHARA Y., 1997.- The role of a crude polysaccharide fraction in the macrophage activation by "Shosaikoto". Phytomedicine, vol. 4 (1): 23-26.

OKIT, MATSUMOTO K, MATSUI T, OSAJIMA Y. J., 1999.Agr Food Chem, vol. 47:550–3.

PALAZZOLO E., GARGANO M. L., VENTURELLA G., 2012.- The nutritional composition of selected wild edible mushrooms from Sicily (southern Italy). International Journal of Food Sciences and Nutrition, vol. 63: 79–83.



- PERE J. P., 1999.- Techniques spectroscopiques en biochimie analytique. Centre Régionale de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, 46p.
- PIERRE G., 2010.-Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. Thèse de Doctorat de l'Université de Rochelle, France. 119-120 p.
- PONTE C. B., ALVES É. A. R., et SAMPAIO R. N. R., 2012.- Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *International Immunopharmacology*, vol. 13: 114-119.
- POPOV S. V., POPOVA G. Y., OVODOVA R. G., BUSHNEVA O. A., et OVODOV Y. S., 1999.- Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 21: 617-624.
- POPOVICI C., SAYKOVA I., BTYLKOWSKI T., 2009.- Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, vol : 4.25-39.
- QIAN J.Y., BAI Y.Y., TANG J et CHEN W., 2015.- Antioxidation and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of barley polysaccharides modified with sulfation. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 64: 104-111.
- RADAI L., BISSATI S., CHENCHOUNI H., 2013.- Etude mycologique et bio- écologique de la truffe blanche du desert (*Tirmania nivea* Desf. Trappe 1971) DANS LA REGION DE OUED M'YA (OUARGLA, SAHARA ALGERIEN). *Revue des BioRessources*, vol. 3 :1.
- RAGSDALE R L., et GRASSO R. G., 1989.- An improved spectrofluorometric assay for quantitating yeast phagocytosis in cultures of murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunological Methods*, vol. 123: 259-267.
- RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., et RICEEVANS C., 1999.- Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26: 1231-1237.
- REIFFOVA K., NEMCOVA R., 2006.- *Journal of Chromatography A* Thin-layer chromatography analysis of fructooligosaccharides in biological samples, vol. 1110 : 214–221.
- ROBYT J. F., 2000.- III / CARBOHYDRATES/ Thin-Layer (Planar) Chromatography.

Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Enzymology, Iowa State University, Ames, IA, USA.  
Copyright.

ROSSI G., CAPITANI L., CECILIANI F., RESTELLI L., PALTRINIERI S., 2013.- Hyposialylated  $\alpha$ 1-acid glycoprotein inhibits phagocytosis of feline neutrophils, *Research in Veterinary Science*, vol. 95:465-471.

ROUËSSE J., 2002.- *Cancer du sein: étape pré-thérapeutique*. Ed. John LibbeyEurotext, Paris: 42p.

RUIZ G., 2005.- *Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges*. Thèse de Doctorat de l'Université De Limoges, France : 38-189p.

RUTHES A.C., SMIDERLE F.R., IACOMINI M., 2015.- D-Glucans from edible mushrooms : A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, vol. 117: 753–761.

SANCHEZ M P., 2006.- *Polysaccharides ayant une activite immunomodulatrice chez les champignons indigènes du Québec*. Thèse en vue d'obtention de grade doctorat, Université Laval de Québec : 119p.

SANTHARAM B., DIVYA V., THIRUPATHI V., 2013.- Anti ulcer activity of ethanolic, aqueous and total aqueous extracts of *coccinia grandis* linn. voigt in pyloric ligature induced ulcers in albino rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 5: 0975-1491.

SARITHA K. V., PRAKASH B., KHILARE V. C., KHEDKAR G. D., MOHAN REDDY Y. et KHEDKAR C. D., 2016- *Mushrooms and Truffles: Role in the Diet*. Elseiver Ltd.

SATO M., H SANO., et IWAKI D., 2003-Liaison directe du récepteur Toll-like 2 à zymosane, et zymosane induit l'activation de NF-kappa B et la sécrétion de TNF- alpha sont régulés à la baisse par poumon collectin tensioactif protéine A. *J.Immunology*, vol: 171.

SCHAICH K.M., TIAN X et XIE J., 2015.-Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functionalfoods*, vol. 14: 111-125.

SCHUMANN G, AOKI R, FERRERO C., 2006.- IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. *Clin Chem Lab Med*,

vol. 44: 1146-1155.

SEBAHOUN G., 2005.- Hématologie clinique et biologique, 3<sup>ème</sup> Edition. Ed. Arnette, France: 527p.

SHAVIT E., SHAVIT E., 2014.- The Medicinal Value of Desert Truffles. Springer Berlin Heidelberg, 323-340 p.

SHI M., YANG Y., HU X., et ZHANG Z., 2014.- Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue. Food chemistry, vol.155: 50-56.

SINGDEVSACHAN S. K., AUROSHREE P., MISHRA J., BALIYARSINGH B., TAYUNG K. et THATOI H. 2016.- Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, vol.7:1-14.

SINGLETON V.L., ROSS J.A., 1965.- Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent, Am. J. Enol. Vitic, vol.16:144- 158.

SIU K., XU L., CHEN X. et WU J. Y., 2016- Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharides isolated from alkaline extract of wild *Armillaria ostoyae* mushrooms. Carbohydrate Polymers, vol.137: 739–746.

SKALSKA-KAMIŃSKA A., MATYSIK G., WÓJCIAK-KOSIOR M., DONICA H., SOWA I., 2009.- Thin-layer chromatography of sugars in plant material. annales universitatis mariae curie skłodowska lublin polonia, vol.22:2-4.

SLAMA A., GORAI M., FORTAS Z., BOUDABOUS A., NEFFATI M., 2012.- Growth, root colonization and nutrient status of *Helianthemum sessiliflorum* Desf. inoculated with a desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin. Saudi Journal of Biological Sciences, 19: 25-29.

STEVEN M M., LENNIE S E., STURROCK R D., et GEMMELL C G., 1984.- Enhanced bacterial phagocytosis by peripheral blood monocytes in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, vol: 43 (3):435-439.

STOJKOVIĆ D., REIS F.S., FERREIRA I.C.F.R., BARROS L., GLAMOČLIJA J., ĆIRIĆ A., NIKOLIĆ M., STEVIĆ T., GIVELI A et SOKOVIĆ M., 2013.- *Tirmania pinoyi*: Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities and in situ control of *Staphylococcus aureus* in chicken soup. Food Research International, vol. 53: 56–62.

- SUN Y., 2014.- Biological activities and potential health benefits of polysaccharides from *Poria cocos* and their derivatives. *International journal of biological macromolecules*, vol. 68: 131-134.
- SYNYTSYA A et NOVAK M., 2009.- Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine*, vol.2:2-17.
- TALBI H., BOUMAZA A., EL-MOSTAFA K., TALBI J et HILALI A., 2015.- Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sc*, vol.6: 1111-1117.
- TAN H. L., ZHANG D., WANG G., YU B., ZHAO S.P., WANG J.W., YAO L et CAO W. G., 2016.- Comparative analyses of flavonoids compositions and antioxidant activities of Hawk tea from six botanical origins. *Industrial Crops and Products*, vol. 80: 123–130.
- TANG Y. J., ZHU L. L., LIU R. S., LI H. M., LI D. S. et MI Z. Y., 2008.- Quantitative response of cell growth and Tuber polysaccharides biosynthesis by medicinal mushroom Chinese truffle *Tuber sinense* to metal ion in culture medium. *Bioresource Technology*, vol. 99:7606–7615.
- TAVANTI A., CAMPA D., BERTOZZI A., PARDINI G., NAGLIK J. R., BARALE R., et SENESI S., 2006.- *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. *Microbes and Infection*, vol. 8:791-800.
- TELLI A., 2009.- Extraction, identification et activité biologique des polyphénols des dattes au cours de différents stades phénologiques (variété Ghars). Thèse De Magister De l'Université KasdiMerbah-Ouargla, Algérie : 77p.
- TOGOLA A., INNGJERDINGEN M., DIALLO D., BARSETT H., ROLSTAD B., MICHAELSEN T. E. et PAULSEN B. S., 2008a- Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterization. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.115: 423–431.
- TOGOLA A., NAESS K. H., DIALLO D, BARSETT H, MICHAELSEN T. E. et PAULSEN B. S., 2008b- A polysaccharide with 40% mono-O-methylated monosaccharides from the bark of *Cola cordifolia* (Sterculiaceae), a medicinal tree from Mali (West Africa). *Carbohydrate Polymers*, vol. 73: 280–288.
- TRACHI M., 2015.-Caractérisation physicochimique des amandes amères (*Prunus amygdalus*). Possibilité de valorisation. Thèse en vue d'obtention de grade Doctorat, université de Boumerdes,

Algérie : 30, 41, 43p.

Trappe J.M., 1979.- The orders, families, and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives) “*Clelandia arenacea*, *Dingleya verrucosa*, *Choiromyces aboriginum*, *Peziza stuntzii*”, new taxa, Fungi. Mycotaxon (9), 297–340 p.

TSENG Y.H., YANG J.H. et MAU J.L., 2008.- Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. Food Chem, vol.107:732–738.

VAMANU E., 2012.- Biological Activities of the Polysaccharides Produced in Submerged Culture of Two Edible *Pleurotus ostreatus* Mushrooms. BioMed Research International.

VELASCO-LEZAMA R., TAPIA-AGUILAR R., ROMÁN-RAMOS R., VEGA- AVILA E., et PÉREZ-GUTIÉRREZ MA. S., 2006.- Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. Journal of Ethnopharmacology, vol. 103: 36-42.

WAFFENSCHMIDT S., JAENICKE L., 1987. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2, 2'-bicinchinate. Anal Biochem, Vol. 165: 337–340.

WANG N., ZHANG Y., WANG X., HUANG X., FEI Y., YU Y. et SHOU D., 2016- Antioxidant property of water-soluble polysaccharides from *Poria cocos* Wolf using different extraction methods. International Journal of Biological Macromolecules, vol.83: 103–110.

WANG P. C., ZHAO S., YANG B. Y., WANG Q. H. et KUANG, H. X., 2016- Anti- diabetic polysaccharides from natural sources: A review. Carbohydrate Polymers, vol. 148 : 86-97.

WANG Q., FANG Y., 2004.- Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. Journal of Chromatography B, vol. 812: 309–324.

WANG S. et MARCONE M.F., 2011.- The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: Truffles. Food Research International, vol. 44: 2567–2581.

WANG Y., YANG Z et WEI X., 2010.-Sugar compositions,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and amylase inhibitory activities of polysaccharides from leaves and flowers of *Camellia sinensis* obtained by different extraction methods. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 47: 534–539.

WARRANT J., 2004.- Etude structurale et propriétés en solution des polysaccharides constitutifs

du mucilage de lin (*Linum usitatissimum*). Thèse Doctorat de l'Université de Picardie Jules Verne, France : 79-80 p.

WILDEMANN B. et OSCHMANN P., 2011.- Laboratory Diagnosis in Neurology. Ed. Thieme, USA.

WU G. H., HU T., HUANG Z. L., JIANG J.G., 2013.- Characterization of water and alkali-soluble polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium sclerotia*. Carbohydrate Polymers, vol. 96: 284–290.

WU Y., CUI S. W., TANG J., Wang Q. et GU X., 2007.- Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited Sterculia seeds. Carbohydrate polymers, vol. 70: 437–443.

WU Z., ZHANG M., XIE M., DAI M., WANG X., HU B., YE H. et ZENG X., 2016.- Extraction, characterization and antioxidant activity of mycelia polysaccharides from *Paecilomyces hepiali* HN1. Carbohydrate Polymers, vol. 137: 541–548.

XIE G. Q., QIN F. X., ZHU S. L., et INOUE A., 2012.- Ni-free Ti-based bulk metallic glass with potential for biomedical applications produced by spark plasma sintering. Intermetallics, vol. 29: 99-103.

XIE G., QIN F., ZHU S., et LOUZGUINE-LUGZIN D.V., 2014.- Corrosion behaviour of porous Ni-free Ti-based bulk metallic glass produced by spark plasma sintering in Hanks' solution. Intermetallics, vol. 44: 55-59.

XIE J.H., XIE M.Y., NIE S. P., SHEN M. Y., WANG Y. X. et LI C., 2010- Isolation, chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. Food Chemistry, vol.119: 1626–1632.

XIONG X., ZHAO L., CHEN Y., RUAN Q., ZHANG C. et HUA Y., 2015.- Effects of alkali treatment and subsequent acidic extraction on the properties of soybean soluble polysaccharides. Food and Bioproducts Processing, vol.94: 239-247.

XU Y., CAI F., YU Z., ZHANG L., LI X., YANG Y. et LIU G., 2016.- Optimisation of pressurised water extraction of polysaccharides from blackcurrant and its antioxidant activity. Food Chemistry, vol. 194: 650–658.

- YAN X., YE R., CHEN Y., 2015.- Blasting extrusion processing: The increase of soluble dietary fiber content and extraction of soluble-fiber polysaccharides from wheat bran. *Food Chemistry*, vol. 180: 106–115.
- YANG J. P., HSU T. H., LIN F., HSU W et CHEN Y., 2012.- Potential antidiabetic activity of extracellular polysaccharides in submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor* LH1. *Carbohydrate Polymers*, vol. 90(1) : 174–180.
- YE CH.L., HU W.L., ET DAI D. H., 2011.- Extraction of polysaccharides and the antioxidant activity from the seeds of *Plantago asiatica* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 49: 466-470.
- YIN X., YOU Q. et JIANG Z., 2011- Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, vol.86:1358-1346.
- YOSHIKAWA Y., HIRATA R., YASUI H., HATTORI M et SAKURAI H., 2010.- Inhibitory effect of CuSO<sub>4</sub> on  $\alpha$ -glucosidase activity in ddY mice. *Metallomics*, vol. 2: 67–73.
- YU S., OVODOV E., EVTUSHENKO V., VASKOVSKY V.E et OVODOWA R.G., SOLOVEVA T.F., 1966.- Thin-layer chromatography of carbohydrates. *Journal of chromatography*, vol. 14.
- ZHANG A., LI X., XING C., YANG J., SUN P., 2014.- Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65: 28–32.
- ZHANG D. Y., WAN Y., XU J. Y., WU G. H., LI L. et YAO X. H., 2016- Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, vol.137: 473–479.
- ZHANG M., CUI S.W., CHEUNG P.C.K., WANG Q., 2007.- Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol*, vol.18:4–19.
- ZHANG S et LI X. Z., 2015.- Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by polysaccharides from the fruit hull of *Camellia oleifera* Abel. *Carbohydrate Polymers*, vol. 115: 38–43.

ZHAO L., WANG K., WANG X., HUANG D. et LIN J., 2012.- Optimisation of extraction procedure for chinese truffle *Tuber sinense* of polysaccharides and effect of the polysaccharides on phagocytoses of macrophages in vivo. Journal of animal and veterinary advences, vol. 11: 1757-1762.

ZHENG R., JIE S., HANCHUAN D. et MOUCHENG W., 2005.- Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*: International Immunopharmacology, vol.5:811-820.

ZHU Z.Y., LUO Y., DONG G.L., REN Y.Y., CHEN L.J., GUO M.Z, WANG X.T., YANG X.Y., ZHANG Y., 2016.- Effects of the ultra-high pressure on structure and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of polysaccharide from Astragalus. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 87: 570–576.

ZHU Z.Y., ZHANG J.Y., CHEN L.J., LIU X.C., LIU Y., WANG W.X et ZHANG Y.M., 2014.- Comparative evaluation of polysaccharides isolated from Astragalus, oyster mushroom, and yacon as inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase. Chinese Journal of Natural Medicines, vol. 12(4): 290-293.

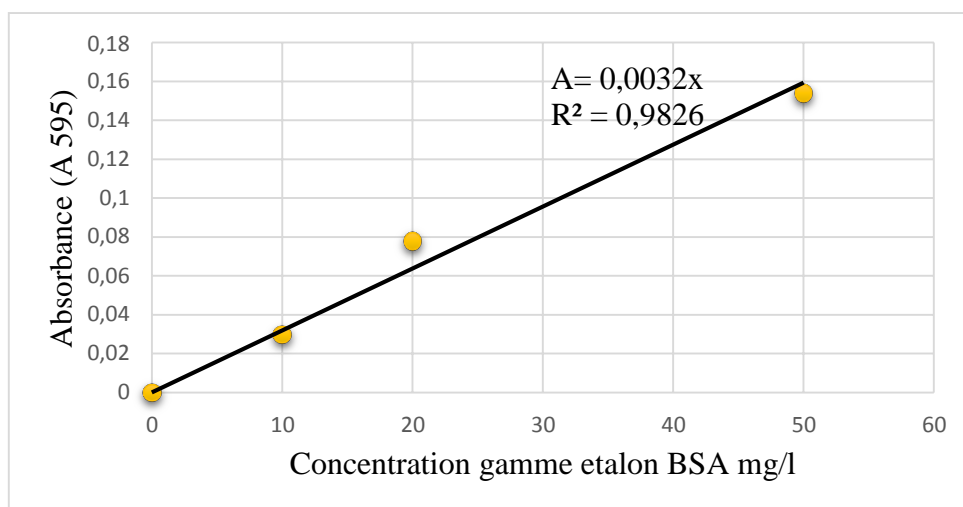


# *Annexes*

---

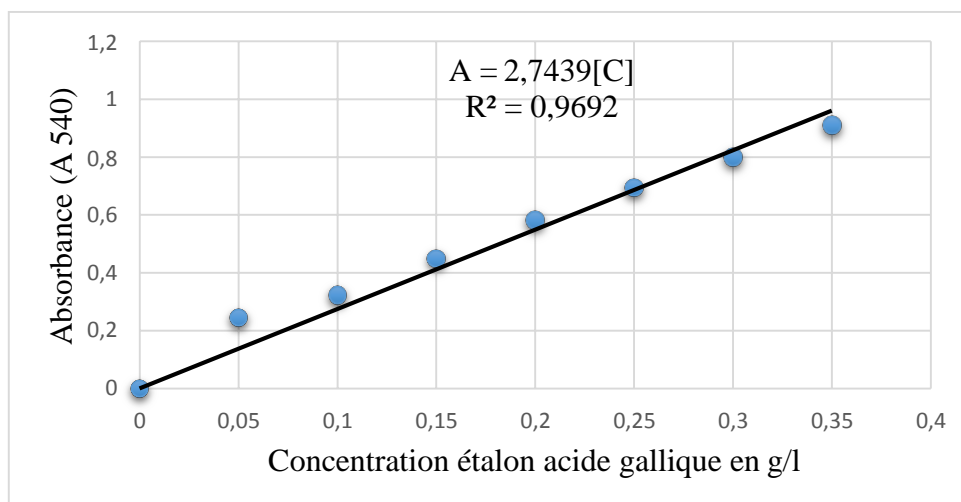
## Annexe 01

Courbe étalon des protéines selon la méthode de BRADFORD



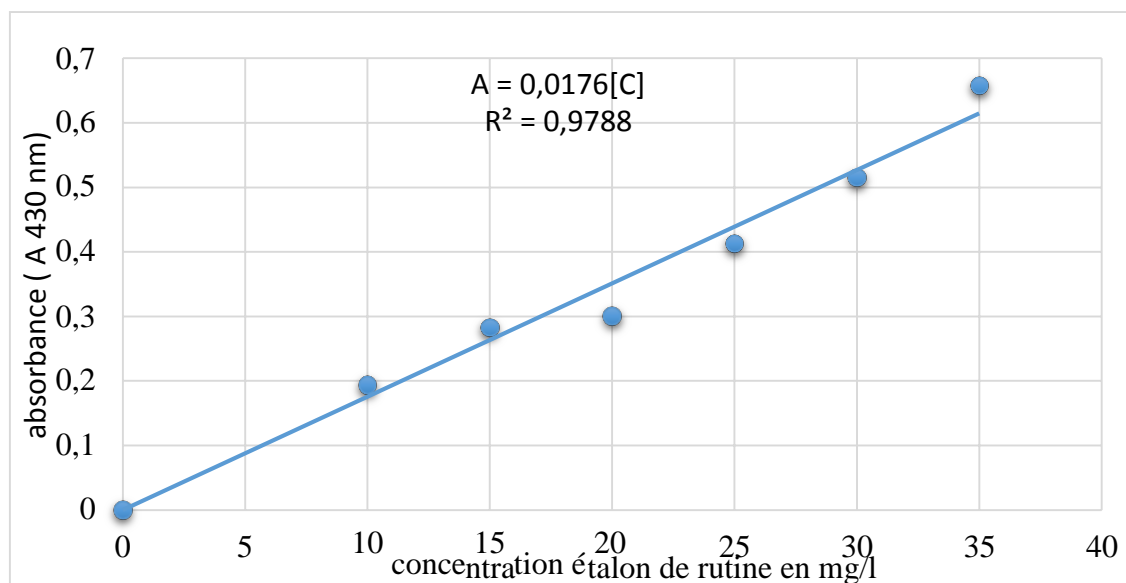
## Annexe 02

Courbe étalon des polyphénols totaux



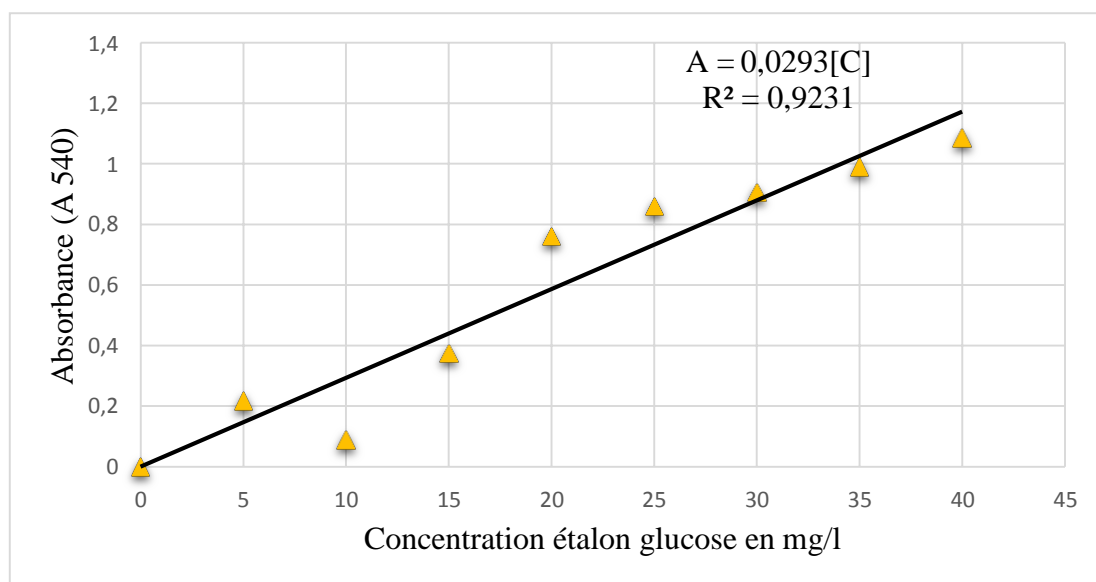
## Annexe 0 3

Courbe étalon des flavonoïdes



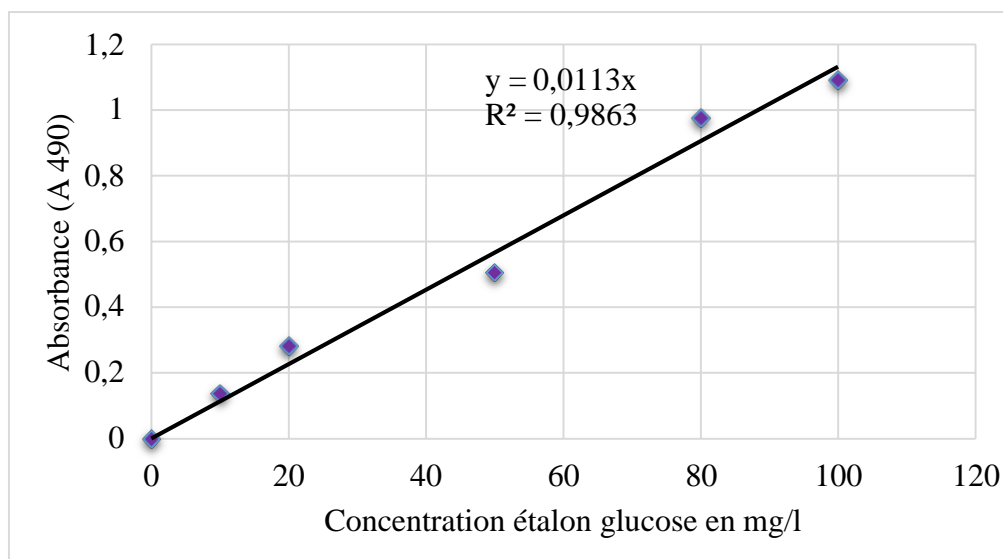
## Annexe 04

Courbe étalon des sucres réducteurs



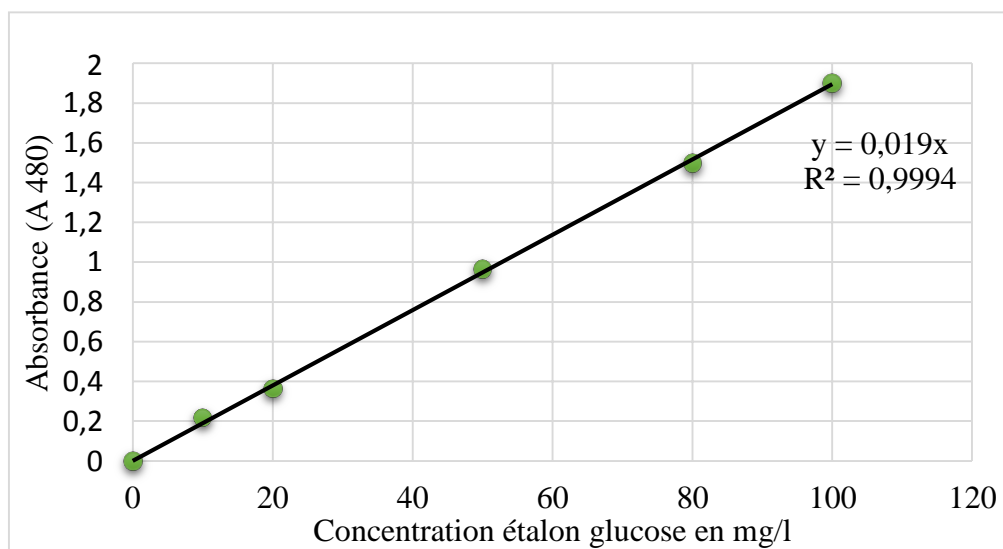
## Annexe 05

Courbe étalons des oses totaux



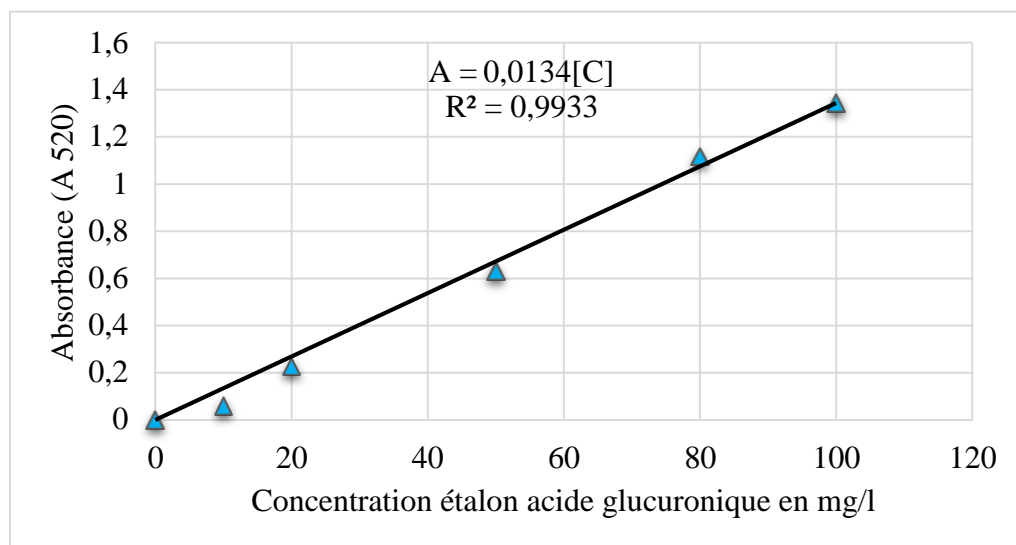
## Annexe 06

Courbe étalon des oses neutres



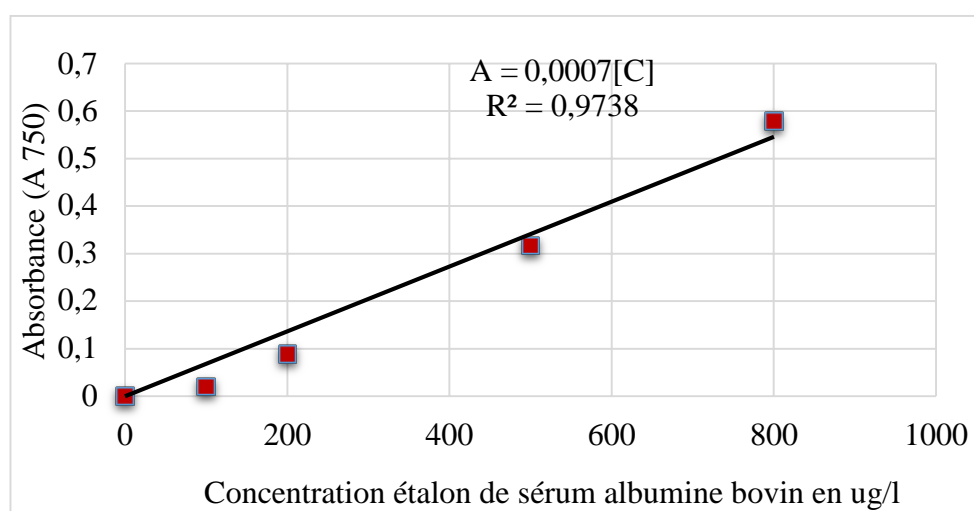
## Annexe 07

Courbe étalon des oses acides



## Annexe 08

Courbe étalon des protéines selon la méthode de LOWRY



## Annexe 09

Préparation des solutions utilisées au cours de l'expérimentation

Solution	Préparation
Préparation de solution d'acide hydrochloridrique à 0,5 M	$C = P \times D \times 10 / MM$ MM : Masse molaire d'HCL= 36,5 g.mol <sup>-1</sup> P : Pureté = 37% D: Densité = 1,17 C: Concentration $C1 = P \times D \times 10 / M = (37) \times (1,17) \times (10) / 36,5 = 11,86M$ La préparation de 100 ml de solution HCL 0,5 M est se faite selon la loi : $C1V1 = C2V2 \quad V1 = C2V2/C1$ $V1 = (100 \text{ ml}) \times (0,5M) / 11,86 M = 4,21 \text{ ml d'HCL}$
Préparation de solution d'acide trifluoroacétique TFA à 2 M	$C = P \times D \times 10 / MM$ MM : Masse molaire de TFA= 114,02 g.mol <sup>-1</sup> P : Pureté = 99% D: Densité = 1,5351 C: Concentration $C1 = P \times D \times 10 / M = (99) \times (1,5351) \times (10) / 114,02 = 13,32 M$ La préparation de 50 ml de solution TFA 2 M est se faite selon la loi : $C1V1 = C2V2 \quad V1 = C2V2/C1$ $V1 = (50 \text{ ml}) \times (2M) / 13,32M = 7,51 \text{ ml de TFA}$
	Masse molaire d'ABTS : 548 g/mol
Solution ABTS	Dissoudre 0,38g d'ABTS dans 100 ml d'eau distillé
Solution de DPPH	Dissoudre 2,5 d'ABTS dans 80ml de méthanol et 100ml d'eau distillé

## Annexe 10

Préparation de NIGRUM

Le réactif de NIGRUM est utilisé pour la révélation des plaques, sa préparation est faite selon GHEBREGZABEIER *et al.* (1975). Deux solutions A et B sont initialement préparées :

- Solution A : dans l'agitateur 2g de diphénylamine est ajoutés à 50ml d'acétone.
- Solution B : 48ml d'acétone est complété jusqu'à 50ml par l'aniline.

Après que les deux solutions A et B sont mélangées et 10ml d'acide orthophosphorique à 85% est ajouté à la solution obtenues.

## Etude de la composition biochimique et activités biologiques de polysaccharides de *Terfezia arenaria* (Terfes rouge) récoltés dans le Sahara Algérien

### Résumé

*Terfezia arenaria*, truffe désertique récolté dans le Sahara Algérienne, est connu traditionnellement par ces valeurs nutritives particulières et ses propriétés thérapeutiques importantes. L'objectif de ce travail est d'étudier la composition chimique et de caractériser les polysaccharides issus de *Terfezia arenaria*, ainsi de tester leurs activités antioxydante, phagocytaire et antidiabétique. L'extrait polysaccharidique est obtenu par macération à l'eau distillée, après prétraitement éthanologique. Leur précipitation est faite par l'éthanol à 96% puis lyophilisé. Le rendement d'extraction est de 9,45%. L'analyse physico-chimique de *Terfezia arenaria* indique 266,7ppm de Sodium, 4633,33ppm de Potassium, 50 ml de NaOH E/100g de matière d'acides gras à courtes chaînes, 24,9% de protéines, 9,65% de cendres, 3,83% de lipides, 1,13% de polyphénols totaux, 0,6% de sucres réducteurs et 0,23% de flavonoïdes. L'analyse par CCM de la composition osidique montre la présence de tréhalose seulement. L'étude de la composition de l'extrait polysaccharidique révèle la présence de 17,27% de protéines, 60,11% d'oses totaux, parmi eux 97,4% sont des oses neutres et 3,22% d'oses acides. L'étude des oses constitutifs de l'extrait polysaccharidique est déterminée par le CCM après hydrolyse par TFA à 2 M durant 4 heures à 100 °C montre la dominance de glucose, d'acide D glucuronique, et d'acide D galacturonique. L'activité antioxydante des polysaccharides de *Terfezia arenaria* est déterminée selon le test de DPPH et ABTS. Le pourcentage d'inhibition maximal des radicaux libres est très négligeable, soit 1,56% et 5,19% pour le DPPH et ABTS, respectivement. Une capacité phagocytaire de 38,67% est marquée chez les polysaccharides de *Terfezia arenaria*, supérieure à celle de contrôle négatif, soit 29,33%. L'activité phagocytaire de l'extrait polysaccharidique est de 9,33% semble appréciable à celle de zymosan, contrôle positif, soit 18,33%. L'effet inhibiteur notable de polysaccharides de *Terfezia arenaria* sur l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase soit 67,67% à 75mg/ml, laisse suggérer une activité antidiabétique potentielle. Ces résultats confirment qu'en plus de la valeur nutritive importante de *Terfezia arenaria*, leurs polysaccharides présentent également des activités biologiques vitales.

**Mots clés :** *Terfezia arenaria*, Sahara, composition, polysaccharides, activités, phagocytaire, antidiabétique.

## study of the biochemical composition and biological activities of polysaccharides *Terfezia arenaria* ( red truffle ) harvested in the Algerian Sahara

### Abstract

*Terfezia arenaria*, desert truffle harvested in the Algerian Sahara, is traditionally known by its particular nutritional values and its important healthy benefits. The objective of this work is to study the chemical composition and characterize the polysaccharides stemming from *Terfezia arenaria* and to test their activities antioxidant, phagocytic and antidiabetic. The polysaccharide extract is obtained by maceration in the distilled water, after pretreatment ethanologique. Their precipitation is made by the ethanol for 96% then lyophilized (freeze-dried). The yield of extraction is 9.45%. The physico-chemical analysis of *Terfezia arenaria* indicates 266.7ppm of Sodium, 4633.33ppm of Potassium, 50 ml of NaOH E/100g of material of fatty acids of short chains, 24.9% of proteins, 9.65% of ashes, 3.83% of lipids, 1.13 % of total polyphenols, 0.6% of reducing sugars and 0.23% of flavonoids. The analysis by TLC of the osidique composition shows the presence of trehalose only. The study of the composition of the polysaccharidique extract reveals the presence of 17.27% of proteins, 60.11% of sugar, among which 97.4% are neutral oses and 3.22% of acids oses. The study of monosaccharides constituent of the polysaccharidique extract determined by the TLC after hydrolysis by TFA to 2 M for 4 hours in 100°C show the dominance of glucose, acid D.glucuronique and of acid D.galacturonique. The antioxidizing activity of the polysaccharides of *Terfezia arenaria* is determined according to the test of DPPH and ABTS. The maximal percentage of inhibition of the free radicals is negligible, that is respectively 1.56% and 5.19% for the DPPH and ABTS. A phagocytic capacity of 38.67% was noticed at the polysaccharides of *Terfezia arenaria*, superior in that of negative control, which is equal to 29.33%. The phagocytic activity of the polysaccharidique extract of value 9.33 % seems significant compared with that of zymosan, positive control which is 18.33%. The notable inhibitive effect of polysaccharides of *Terfezia arenaria* on the enzyme  $\alpha$ -glucosidase, with a value of 67.67% in 75mg/ml, suggests a potential antidiabetic activity. These results confirm that besides the important nutritional value of *Terfezia arenaria*, their polysaccharides also present vital biological activities.

**Keywords:** *Terfezia arenaria*, Sahara, composition, polysaccharides, activities, phagocytic, antidiabetic.

## دراسة المكونات البيوكيميائية والانشطة البيولوجية للسكريات المتعددة المستخلصة من *Terfezia arenaria* (الترفاس الأحمر) المجنية من الصحراء الجزائرية

### ملخص

*Terfezia arenaria* كمأة تنمو في الصحراء الجزائرية، تعرف محلها بقيمتها الغذائية وخصائصها العلاجية الهامة. يهدف هذا العمل إلى دراسة التركيب الكيميائي لـ *Terfezia arenaria* وتحديد السكريات المتعددة الخاصة بها، إضافة إلى اختبار نشاطها المضاد للأكسدة، نشاطها البلعمي و نشاطها المضاد للسكري. تم الحصول على مستخلص متعدد السكريات عن طريق نقع مسحوق *Terfezia arenaria* المجفف في الماء بعد معالجة مسبقة بالايثانول. يتم ترسيب المستخلص باستعمال الايثانول 96 % ثم تجفيفه عن طريق التجفيد. المردود الكتلتي لمستخلص السكريات المتعددة المتحصل عليه هو 9.45%. تحليل الفيزيو-كيميائي لـ *Terfezia arenaria* إلى وجود 266.711 جزء من المليون من الصوديوم، 4633.33 جزء من المليون من البوتاسيوم، 50 مل مكافئ لهيدروكسيد الصوديوم/655 غ من الأحماض الدهنية الحرة، 24.9% بروتينات، 19.5% رماد، 3.83% دهون، 6.64% بوليفينولات كلية، 1.13% سكريات مختزلة و 3.83% فلافونيدات. أظهر تحليل المكونات السكرية عن طريق استعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عن وجود التريهالوز فقط. كشفت دراسة مكونات مستخلص السكريات المتعددة عن وجود 17.27% بروتينات، 60.11% سكريات كلية من بينها 97.4% سكريات أحادية، و 3.22% سكريات حمضية. كما أظهرت دراسة السكريات البسيطة المكونة لمستخلص متعدد السكريات بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بعد القيام بعملية تحليل بواسطة 7 مول من TFA لمدة 4 ساعات وفي 100 °C درجة مئوية عن هيمنة الجلوكوز، حمض الجلوكورونيك، حمض الغلاكتورونيك. يتم تحديد النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص السكريات المتعددة لـ *Terfezia arenaria* عن طريق استعمال اختبار DPPH و ABTS. حيث سجلت نسبة تثبيط ضئيلة جدا للجذور الحرة قدرت بـ 1.56% و 5.19% للـ DPPH و ABTS على التوالي. القدرة البلعمية لمستخلص السكريات المتعددة قدرت بـ 38.67% أكبر من النسبة المسجلة لدى الشاهد السليبي والتي قدرت بـ 29.33%. سجل النشاط التثبيطي للسكريات المتعددة لـ *Terfezia arenaria* على انزيم الالفا جلوجوزيداز نسبة 67.67% بتركيز 75 ملغ/مل مما يسمح لنا بالإشارة إلى وجود نشاط مضاد للسكري قوي لمستخلص السكريات المتعددة. و تؤكد هذه النتائج أنه و إضافة إلى القيمة الغذائية الهامة لـ *Terfezia arenaria* فإن السكريات المتعددة الخاصة بها تتميز بـ وجود أنشطة بيولوجية حيوية.

**الكلمات المفتاحية:** *Terfezia arenaria* الصحراء، مكونات، السكريات المتعددة، النشاطات، البلعمة، مضاد السكري