

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 :

M^{elle} LIMAM Hala

**Contribution à l'étude des polysaccharides issus de la
gomme *Commiphora myrrha* Nees. (BURSERACEAE)**

Soutenu publiquement

Le : 31/05/2016

Devant le jury :

Président	SIBOUKEUR Oum El kheir	Pr.	Univ. Ouargla
Encadreur	BOUAL Zakaria	MCA	Univ. Ouargla
Examineur	SAYAH Zineb	MAA	Univ. Ouargla

Année Universitaire : 2015/2016

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu « le tout Puissant » de nous avoir accordé la force et le courage afin de réaliser ce modeste travail.

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,

Madame SIBOUKEUR Oumelkheir, Professeur au Département des Sciences biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui nous fait l'honneur de présider ce jury.

Nous présentons nos remerciements les plus sincères à Madame SAYAH Zineb, Maître assistante au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous sommes particulièrement honoré de vous avoir vu assurer d'examiner notre mémoire, mais aussi pour votre présence et vos conseils tout au long de notre cursus universitaire.

Nous remercions le Laboratoire d'analyse médical « IBN ROCHD » Ghardaïa, et en particulier son Directeur, Dr. AMMI SAÏD Mustapha de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.

Enfin, je remercie mes parents bien sûr pour leur soutien et encouragement tout le long de mes études et ma vie, mes sœurs surtout Sara et Karima et mes frères, toute ma famille en particulier ma Grand-Mère, Houriya, Malika et Yamina pour leurs encouragements permanents. Je remercie ainsi mes amies.

LIMAM Hala

Liste des abréviations

ABTS	2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
Ara	arabinose
Araf	arabinofuranose
BSA	sérum albumine bovine
CCM	chromatographie sur couche mince
CuO²⁺	oxyde de cuivre
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
Gal	galactose
Gal <i>p</i>	Galactopyranose
Gal<i>p</i>A	acide galacturonique pyranose
Glc	glucose
Glc. A	acide glucuronique
Glc<i>p</i>A	acide glucuronique pyranose
Man	mannose
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MgSO₄	sulfate de magnésium
m-HDP	méta-hydroxydiphenyl
NADPH₂	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	hydroxide de sodium
NO	oxyde nitrique
OH	hydroxyle d'oxygène
PA	phagocytosis activity
PBS	phosphate buffer saline (tampon phosphate saline)
pH	potentiel d'hydrogène
PS	polysaccharides
R_f	rapport frontal
Rhap	rhamnopyranose

rpm	rotation par minute
TNF	tumor necrosis factor
TPTZ	2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine
Xyl	xylose
Xylp	xylopéranose

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation	15
02	Origine et type des appareils utilisés au cours de l'expérimentation	17
03	Gamme étalon du glucose	20
04	Gamme étalon de glucose	21
05	Gamme étalon d'acide glucuronique	23
06	Gamme d'étalonnage de sérum albumine bovin de dosage des protéines selon la méthode de LOWRY <i>et al.</i> , (1956)	24
07	Gamme d'étalonnage de sérum albumine bovin de dosage des protéines selon la méthode de BRADFOED (1976).	25
08	Gamme étalon de l'acide gallique	26
09	Dilutions de la solution mère de l'extrait polysaccharidique	32
10	Test de l'activité anti-diabétique	33
11	Composition de PBS selon BURNAT <i>et al.</i> (2013)	38
12	Composition de solution Hanks selon HANKS (1975)	38
13	Test de phagocytose	41
14	Composition biochimique de l'extrait polysaccharidique de la de la gomme <i>Commiphora myrrha</i> .	48
15	Rapports frontaux (R_f) des oses étalons dans les quatre systèmes de CCM	50

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	01.- Différentes étapes d'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la gomme <i>Commiphora myrrha</i>	19
02	Equation de la réaction selon la méthode de LOWRY	24
03	Equation de la réaction selon la méthode de BRADFORD	25
04	Réduction du radical ABTS ^{•+} par l'agent antioxydant (SCHAICH <i>et al.</i> , 2015)	34
05	Réduction de radical libre DPPH [•] par l'agent antioxydant (SCHAICH <i>et al.</i> , 2015).	36
06	Différentes étapes de tests de phagocytose	45
07	Chromatogrammes des polysaccharides de la gomme dans les systèmes (I, II, III, IV) par CCM	51
08	Pourcentages d'inhibition (%) de l' α -D-glucosidase en présence de l'acarbose ou de l'extrait polysaccharidique.	53
09	Activités anti oxydantes de l'extrait de polysaccharides issus de la gomme de <i>Commiphora myrrha</i>	55
10	Courbe d'étalonnage de Trolox de test ABTS	56
11	Courbe d'étalonnage de Trolox de test DPPH	56
12	Capacité phagocytaire de l'extrait polysaccharidiques de la gomme <i>Commiphora myrrha</i> (CM)	59
13	Activité phagocytaire de l'extrait polysaccharidiques de la gomme <i>Commiphora myrrha</i> (CM)	59

Liste des photos

N°	Titre	Page
01	Gomme de <i>Commiphora myrrha</i>	14
02	Observation microscopique de la phagocytose des <i>Candida albicans</i> en présence des zymosan (x 1000) (Photo Originale)	60
03	Observation microscopique de la phagocytose des <i>Candida albicans</i> en présence des polysaccharides de la gomme <i>Commiphora myrrha</i> (x 1000) (Photo Originale)	60

Liste des annexes

N°	Titre	Page
01	Courbe d'étalonnage des oses totaux	83
02	Courbe d'étalonnage des oses neutres	83
03	Courbe d'étalonnage des oses acides	83
04	Courbe d'étalonnage des protéines selon la méthode de LOWRY	84
05	Courbe d'étalonnage des protéines selon la méthode de BRADFORD	84
06	Courbe d'étalonnage des polyphénols	84
07	Préparation des solutions utilisées au cours de l'expérimentation (solution TPTZ et tampon acétate)	85

Table de matière

Remerciements	I
Liste des abréviations	III
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VII
Liste des photos	VIII
Liste des annexes	IX
Introduction	1

Chapitre I.- Synthèse bibliographique

I.1.- Sources et activités biologiques des polysaccharides bioactifs	5
I.1.1.- Polysaccharides bioactifs des algues et des lichens	5
I.1.2.- Polysaccharides bioactifs des herbes	7
I.1.3.- Polysaccharides bioactifs des fibres alimentaires	9
I.1.4.- Polysaccharides bioactifs des autres sources	10

Chapitre II.- Méthodologie de travail

II.1.- Principe de l'étude	13
II.2.- Choix de la plante	13
II.3.- Matériel de l'étude	14
II.4.- Etude des polysaccharides	18
II.4.1.- Extraction des polysaccharides de la gomme-résine de <i>Commiphora myrrha</i>	18
II.4.2.- Compositions de l'extrait brut des polysaccharides de la gomme <i>Commiphora myrrha</i>	21
II.4.3.- Caractérisation des résidus glycosidiques	30
II.4.4.- Activités biologiques de l'extrait polysaccharidique	34

Chapitre III.- Résultats et discussions

III.1.- Rendement polysaccharidique	48
III.2.- Composition de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble	48
III.3.- Caractérisation par chromatographie sur couche mince des polysaccharides	49
III.4.- Activités biologiques de polysaccharides	53
III.4.1.- Activité anti diabétique	53
III.4.2.-Activité anti-oxydante	54
III.4.3.- Activité phagocytaire	58
Conclusion et perspectives	63
Références bibliographiques	66
Annexes	83
Résumés	

Introduction

I.- Introduction

Durant les deux dernières décennies, les chercheurs ont réévalué l'importance des glucides et, envisagent pour eux de nombreuses applications industrielles, comme produits pharmaceutique, biomatériaux, denrées alimentaires et biocarburants, ainsi dans la médecine (LIU *et al.*, 2015). Dans le secteur biomédical, ils sont utilisés en raison de leur large spectre de propriétés thérapeutiques, de leur abondance, de leurs sources renouvelables, non-toxiques, leur biocompatibilité et biodégradables (BOUAL, 2014; LIU *et al.*, 2015). Ainsi comme matière première dans les industries papetière et agroalimentaire. Ces polymères hydrosolubles, extraits majoritairement des végétaux établissent des interactions spécifiques avec l'eau et peuvent épaissir, stabiliser ou gélifier une solution, même à faibles concentrations (YANG et ZHANG, 2009; BOUAL, 2014). L'intérêt des polysaccharides ne se limite pas à leurs propriétés rhéologiques; ainsi ils ont un rôle biologique (YANG et ZHANG, 2009).

Naturellement, les polysaccharides bioactifs existent largement dans les plantes, les micro-organismes (xanthane...), algues et lichens (fucanes, carraghénane, β glucane...), crustacés (ex: chitine...) et animaux (héparines et chondroïtine sulfate...) (YANG et ZHANG, 2009; LIU *et al.*, 2015).

Ces polysaccharides bioactifs montrent diverses activités biologiques importantes, telles que l'activité anti-tumorale, immuno-modulateurs et des effets anti-inflammatoires, qui sont fortement affectées par leur structure chimique et la conformation de la chaîne (BRUNETON, 2009; YANG et ZHANG, 2009; WIJESKARA *et al.*, 2011; THAKUR *et al.*, 2012).

Des études réalisés par SUAREZ *et al.*, (2006) ont rapportés que l'activité immunostimulantes d'un arabino-galactanes issus de *Chlorella pyrenoidosa* est dépend de leurs poids moléculaire. Les arabino-galactanes de poids moléculaire élevé présentent une activité immunostimulante, mais les fractions de plus bas poids moléculaire n'ont pas.

Autres recherches montrent que les activités de polysaccharides ne sont pas seulement dépendantes de leurs structures chimiques, mais sont également liées à leur conformation de la chaîne (YANG et ZHANG, 2009).

L'activité anti-tumorale des (1 \rightarrow 3) β -D- glucane, pour certains polysaccharides semble être liée à la conformation hélicoïdale triple, comme le lentinan extrait de *Lentinus edodes* (WANG *et al.*, 2014).

En outre, les polysaccharides dans les micro-organismes (champignons, levures, et bactéries), les algues, les plantes et les animaux sont toujours physiquement et / ou chimiquement emmêlées avec d'autres biomolécules ; protéines, poly-nucléotides, lipides, la lignine, et certaines substances minérales inorganiques (LIU *et al.*, 2015).

L'activité immuno-modulatrice des polysaccharides issus des végétaux permet de stimuler ou d'inhiber divers propriétés du système immunitaire (WATSON et PREEDY, 2013). SCHEPETKIN et QUINN (2006) montrent que le mécanisme de base des activités immunostimulantes, anti-tumorales, bactéricides des polysaccharides végétaux, semble avoir lieu par leur interaction avec les structures osidiques des cellules immunitaires pour augmenter l'activité phagocytaire des macrophages, des granulocytes et la cyto-toxicité des cellules Natural Killer (BACHELET, 2013). Ainsi, qu'ils peuvent induire la production de certains types de cytokines à partir de ces cellules (WATSON et PREEDY, 2013) tels qu'IL-1, IL-6, TNF- α et IFN- γ par les macrophages et les cellules dendritiques. Ils peuvent également activer le complément et la production d'anticorps (BACHELET, 2013).

CHUAN-LI *et al.* (2015) ont montré que les deux fractions polysaccharides isolés des racines de *Smilax glabra* possèdent des activités anti-inflammatoires par inhibition de la production des cytokines TNF- α et IL-6 et monoxyde d'azote via la diminution de la phosphorylation des protéines kinases de voies MAPKs: ERK1/2 et JNK.

En outre, La phagocytose joue un rôle primordial dans la défense des cellules humaines et animales contre les différents facteurs infectieux et non infectieux. Sachant que les phagocytes agissent comme des cellules régulatrices et effectrices du système immunitaire, l'amélioration de leur fonction dans la thérapie contre le cancer et les infections microbiennes aura une importance majeure (POPOV *et al.*, 1999). Ce processus est accéléré par des récepteurs Fc, du complément, du mannose, et des TLRs (Toll-Like Receptors) (phagocytose médiée par les récepteurs) (BURMESTER et ANTONIO, 2000).

Plusieurs études ont montré que les gommages des plantes médicinales ont des activités biologiques très importantes. La stimulation de l'activité phagocytaire des polysaccharides issus de la gomme est signalée. MORETAO *et al.* (2003) ont étudié des hétéro-polysaccharides acides (ARAGAL) issus de la gomme d'*Anadenanthera colubrina* (Angico branco). Une concentration de 25 mg /ml d'hétéro-polysaccharides acides est suffisante pour induire une capacité phagocytaire maximale des macrophages, cet effet est dose-dépendante.

De même, l'effet anti diabétique des polysaccharides issus des gommages est rapporté. A titre d'exemple AHMED *et al.* (2016) ont rapporté que la gomme arabe a un effet hypoglycémiant et hypo-cholestérolémiant et anti obésité, ainsi une activité anti-oxydante (AHMED *et al.*, 2015). Les polysaccharides issus d'*Acacia tortilis*, ont montré un effet

hypoglycémiant en inhibant l'enzyme α -D-glucosidase in vitro ainsi que chez des modèles in vivo (BISHT *et al.*, 2013).

Le présent travail s'oriente sur l'étude des polysaccharides issus de la gomme de *Commiphora myrrha* récoltée dans la région de sud algérienne. L'objectif recherché vise à caractériser les polysaccharides et de tester leurs activités biologiques en s'élargissant leurs spectres d'exploitation dans le domaine biomédical.

Il est structuré en trois parties ; la première est consacrée à une synthèse bibliographique, décrit les polysaccharides comme principes actifs utilisés en phytothérapie, la deuxième partie, aborde ensuite la partie expérimentale, en décrivant les principales techniques d'extraction de polysaccharides hydrosolubles à partir de la gomme *Commiphora myrrha*; en déterminant leur composition globale et en caractérisant les résidus glycosidiques par chromatographie sur couche mince. Une étude biologique de l'extrait polysaccharidique concernant l'activité anti diabétique anti-oxydante, et phagocytaire et le troisième chapitre expose les principaux résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achève ce travail.

Chapitre I.-

Synthèse bibliographique

Les polysaccharides naturels provenant de différentes sources ont longtemps étudiés et largement utilisé dans différents domaines (YANG et ZHANG, 2009). Se sont des biopolymères composés de monosaccharides reliés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ces structures peuvent être linéaires ou contiennent des chaînes latérales ramifiées (ZONG *et al.*, 2012). Le nombre d'unités de monosaccharides et le degré de polymérisation, varient selon la source. Plusieurs facteurs influencent la structure des polysaccharides ; nature et anomérie des unités de base (monosaccharides), type de liaison glycosidique, présence des groupements fonctionnels (carboxyle, sulfate, etc.) et le poids moléculaire influençant directement les propriétés des polysaccharides (LEUNG *et al.*, 2006).

I.1.- Sources et activités biologiques des polysaccharides bioactifs

Les polysaccharides peuvent être classés en plusieurs manières possibles, sur la base de la structure, la composition chimique, la solubilité, sources et applications (ZONG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015).

En ce qui concerne la composition chimique, les polysaccharides sont classés en deux ; homo-polysaccharides, qui sont des homo-glycans constitués d'un seul type de monosaccharide, par exemple, cellulose et glycogène qui sont des polymères de glucose; des hétéro-polysaccharides ou des hétéro-glycans, constitués de plusieurs stéréoisomères de monosaccharide, tel que l'héparine, qui est constituée de, l'acide L-iduronique-2-O-sulfate (90% de ses composants) et D-glucosamine-N-sulfate, 6-O-sulfate (10% de ces composants)(YANG et ZHANG, 2009).

I.1.1.- Polysaccharides bioactifs des algues et des lichens

Les polysaccharides dans les algues et les lichens ont un intérêt croissant en raison de leurs excellentes propriétés physiques, comme épaississant, gélifiant et stabilisant (BRUNETON, 2009). Egalement en raison de leurs activités biologiques bénéfiques, tels que anticoagulant, anti thrombotique, anti oxydantes, antivirales, anti inflammatoire, anti tumoral, et immuno-modulatrice (OLAFSDOTTIR et INGOLFSOTTIR, 2001; WIJESKARA *et al.*, 2011).

Les algues marines sont considérées comme des sources précieuses de composés bioactifs de structures diverses (NGOA et KIMA, 2013). Les trois grandes classes d'algues auxquelles appartiennent les espèces actuellement utilisées ont chacune leurs polysaccharides caractéristiques, sont essentiellement riche en polysaccharides sulfatés : acide alginique, laminaranes et fucanes des Phaeophyceae, galactanes sulfatés, carraghénane, et agar agar des Rhodophyceae, des polysaccharides complexes, souvent sulfatés comme l'ulvanes des Chlorophyceae (BRUNETON, 2009; LIU *et al.*, 2015).

Ces polysaccharides sulfatés présentent de nombreux activités biologiques, l'activité antioxydant, dont la plus forte activité anti oxydante qui permet la protection du corps humain contre les dommages causés par des espèces réactives de l'oxygène est signalé aux fucoïdanes (suivie d'alginate et laminarane) (BARAHONA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2015).

Selon KIM *et al.* (2007) les polysaccharides sulfatés issus d'algue brune *Sargassum fulvellum* sont les plus puissants piègeurs de NO que les antioxydants commerciaux, tels que le butyhydroxyanisole (BHA) et le tocophérol.

Une activité antiviral contre les agents pathogènes pour l'homme parmi lesquels l'Herpes simplex, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la dengue est rapporté (BARDOULAT, 2007). L'activité antivirale de carraghénanes, fucoidans et arabinogalactanes sulfatés est prouvé en exerçant des effets inhibiteurs sur l'entrée de l'herpès et les virus VIH dans les cellules (HEMMINGSON *et al.*, 2006; WIJESEKARA *et al.*, 2011).

Les fucanes sulfatés (fucanoides) issus des algues brunes ont montré une activité anticoagulante et anti-thrombique (BARDOULAT, 2007; GUERRA DORE *et al.*, 2013). Ceci est signalé par BARAHONA *et al.* (2014) pour les fucanes extrait de *Gigartina skottsbergii*. Cette activité anticoagulant est identifié ainsi pour le carraghénane d'algues rouges (CARLUCCI *et al.*, 1997; VO *et al.*, 2011; PRAJAPATI *et al.*, 2014).

D'autre part, plusieurs études ont montré que les polysaccharides sulfatés ont des activités immuno-modulatrice et anti inflammatoire (GUERRA DORE *et al.*, 2013).

LEIRO *et al.* (2007) ont montré que les polysaccharides sulfatés extraites de l'algue verte *Ulva rigida* induisent une augmentation deux fois en plus l'expression de plusieurs chimiokines et interleukines et aussi induit la production de nitrites. Ces polysaccharides stimulent les macrophages pour sécréter la prostaglandine E2 (PGE2) et induisent une augmentation de l'expression de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et l'oxyde nitrique synthase-2.

Toutefois, les polysaccharides sulfatés peuvent avoir un potentiel biomédical en stimulant le système immunitaire ou en contrôlant l'activité des macrophages pour réduire les effets négatifs associés (LEIRO *et al.*, 2007).

En général, l'activité biologique des polysaccharides provenant d'algues marines est liée à la taille moléculaire, le type de glucide, la teneur du sulfate, de liaison et de type géométrie moléculaire qui sont connus pour jouer un rôle dans leurs activités (ZHANG *et al.*, 2010).

Les lichens sont utilisés à des fins économiques écologiques, de médicaments et d'autres depuis plus de 100 ans, et ces effets bénéfiques sont corrélés dans une certaine mesure avec leur teneur en polysaccharides. Environ 100 espèces sont étudiés pour leurs

polysaccharides et leur composition (KARUNARATNE *et al.*, 2012). Les polysaccharides isolés à partir de lichens sont principalement linéaire ou substitué α - et / ou β -glucanes (LIU *et al.*, 2015).

Plusieurs études ont signalé que les glucanes issus des lichens ont des activités biologiques très importantes tels que l'activité anti-tumorale, activité antivirale et l'effet immuno-modulateur (KARUNARATNE *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015). Les β -glucanes et d'autres polysaccharides immuno-modulateurs sont isolés à partir des lichens, y compris le lichénane et isolichénane de *Cetraria islandica*, ont stimulé une large gamme de réponses immunitaires, telles que la libération de cytokines, la production de ROS et la production de NO et la libération de métabolites de l'acide arachidonique (SCHEPETKIN et QUINN 2006).

Comme dans le cas des polysaccharides d'origine végétale, l'immuno-modulation des macrophages par β -glucanes implique l'activation de NF-kB (BATTLE *et al.*, 1998; SCHEPETKIN et QUINN 2006). Le galactomannane de *Morchella esculenta* a augmenté de manière significative l'activité de NF-kB dans les cellules THP-1 monocytaires humaines (SCHEPETKIN et QUINN 2006; DUNCAN *et al.*, 2002).

I.1.2.- Polysaccharides bioactifs des herbes

En médecine traditionnelle de nombreux pays, comme la médecine traditionnelle chinoise, la médecine Kampo japonaise, Ayurveda Indienne, et phyto-médecine dans les pays occidentaux, les herbes ont été utilisés pour traiter différents types de maladies (LIU *et al.*, 2015). Diverses études ont montré que les effets thérapeutiques des herbes sont liés à leurs composants tels que les alcaloïdes, terpénoïdes, flavonoïdes, saponines, tanins, et surtout les polysaccharides (TANG *et al.*, 2003a,b; LIU *et al.*, 2015).

Les polysaccharides extraits des herbes médicinales ont récemment attiré une attention croissante de la recherche en raison de leurs activités biologiques très importantes (LIU *et al.*, 2015). Tels que l'activité immunostimulante, l'activité anti-oxydante, antivirale, l'effet de neuro-protection (THAKUR *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2013; NIE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016).

Ces biomolécules agissant par stimulation du système immunitaire de l'homme, inhibition la réplication virale, piégeage des radicaux libres, et ainsi l'inhibition de l'oxydation des lipides, et l'effet neuro-protection en protégeant les neurones contre l'excito-toxicité de glutamate dans le cerveau Alzheimer (THAKUR *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2013; NIE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016;). Ces activités sont observées pour les polysaccharides issus de *Lycium barbarum* L. (JIN *et al.*, 2013); *Agave sisalana* (ZHANG *et al.*, 2014), *Prunella vulgaris* (CHIU *et al.*, 2004).

Nombreuses études ont suggéré que les polysaccharides des herbes peuvent inhiber la croissance tumorale à travers des mécanismes telles la prévention de la tumorigenèse par la consommation orale de préparations actives; une activité anti-tumorale directe par induction de l'apoptose des cellules tumorales; l'activité immuno-potentialisante en combinaison avec la chimiothérapie; et l'inhibition d'une métastase tumorale (ZONG *et al.*, 2012). Les polysaccharides acides extraits de *Cymbopogon citratus* montrent un effet apoptotique sur les cellules cancéreuses par la régulation de la caspase-3, la régulation de gènes de la famille bcl-2, suivie par la libération de cytochrome c (THANGAM *et al.*, 2014).

L'effet anticancéreux et anti-métastatique d'Angelan, polysaccharide pectique purifié des racines d'*Angelica gigas* Nakai, est par la stimulation de l'immunité de l'hôte et inhibent directement l'adhérence des cellules cancéreuses (ZONG *et al.*, 2012).

Des polysaccharides isolés des racines d'*Astragalus membranaceus* ont montré un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses, en régulant l'expression des gènes P53 et PTEN (ZONG *et al.*, 2012).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont noté que l'hétéro-polysaccharide acide issu des fruits de *Lycium barbarum* L.(Solanaceae) possède une activité antidiabétique par augmentation du métabolisme de glucose et la sécrétion croissante d'insuline et en favorisant la prolifération pancréatique de cellules β (JIN *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013).

Les effets anti-compléments des polysaccharides issus de plantes médicinales reçoivent une attention répandue. En citant comme exemple l'étude de XU *et al.* (2007) sur les polysaccharides des racines de *Bupleurum smithii*.

Phyllanthus niruri Linn est une plante médicinale importante appartenant à la catégorie des Rasayana connu comme Bhumi Amla en langue vernaculaire. Dans diverses études menées sur les xylanes, isolé à partir de *Phyllanthus niruri*, l'effet anti ulcère et l'effet hépato-protectrice sont rapportés (THAKUR *et al.*, 2012).

MELLINGER *et al.* (2005) ont montré un effet anti-ulcère de l'hétéro-xylanes acides purifiés à partir de la plante *Phyllanthus niruri* qui a inhibé significativement les lésions gastriques induit par l'éthanol chez le rat.

D'autre part, MA *et al.*, (2012) ont rapporté l'effet hépato-protecteur des polysaccharides extraits des rhizomes de *Stachys floridana* shuttlew. ex Benth contre l'hépatotoxicité aiguë induite par le tétrachlorure de carbone. Ceci en améliorant les activités des enzymes anti-oxydantes SOD et CAT et GSH dans les foies des souris traitées par CCl₄. Il est suggéré que le système antioxydant dans le foie a tendance à être normalisé par l'action protectrice de polysaccharides de *Stachys floridana* shuttlew. ex Benth.

I.1.3.- Polysaccharides bioactifs des fibres alimentaires

L'expression fibres alimentaires universellement adoptée par les nutritionnistes et les diététiciens est difficile à définir car elle représente plus un concept nutritionnel et physiologique qu'une catégorie définie de substance chimique (BRUNETON, 2009).

Ce terme initialement employé pour désigné « les résidus végétaux résistantes à la digestion par les enzymes endogène de tractus digestif de l'homme » ce qui inclut aussi bien les macromolécules des parois cellulaires des végétaux que certains polysaccharides intracellulaires. Une telle définition physiologique explique bien la notion de fibres, mais ne permet pas de les décrire. Pour ce faire, il est nécessaire de prendre en compte des critères chimiques et de considérer que les fibres alimentaires sont constituées par « l'ensemble de la lignine et des polysaccharides végétaux et d'autres que α glucane bien qu'elles puissent aussi inclure d'autres composants mineurs » (DIEZ et ISTASSE, 1996; BRUNETON, 2009).

Certaines auteures et certains organismes officiels réduisent les fibres alimentaires aux seuls polysaccharides non amylacés (GODIN *et al.*, 2011). Qui sont classé selon la solubilité dans l'eau en fibres insoluble : Cellulose, hémicelluloses, lignine et fibres solubles : pectine, gommes, mucilages et l'inuline (BRUNETON, 2009).

Les polysaccharides des fibres alimentaires jouent un rôle physiologique et fonctionnel important dans la prévention des maladies chroniques non transmissibles, en raison de leur effet notamment sur le transit intestinal, la saturation, le profil plasmatique des lipides, la réponse glycémique et l'oxydation cellulaire (BRUNETON, 2009). Certains de ceux, peuvent être actifs, sous leur forme native et d'autres après des traitements chimiques /enzymatiques; comme le cas de l'inuline qui doit fermenter sous l'influence de la microflore du colon (AL-SHERAJI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015).

Cette fermentation se traduit par la libération de dioxyde de carbone, de méthane, d'hydrogène et des acides gras à court chaines (AGCC notamment l'acide butanoïque) afin de prévenir de nombreux troubles gastro-intestinaux (BRUNETON, 2009).

La cellulose, l'hémicellulose et la lignine constituant les fibres insolubles qui ont un effet double, effet sur la masse des selles qui est augmentée dans des proportions souvent importantes, cette action grâce à la capacité de rétention de l'eau et à la taille des fibres. L'augmentation de la population bactérienne participe également à l'accroissement du volume de fèces (BRUNETON, 2009; KENDALL *et al.*, 2012).

L'autre effet des fibres porte sur la durée du transit qui est normalisée aux alentours de 48 heures (BRUNETON, 2009; KENDALL *et al.*, 2012).

Cet effet d'encombrement est peut être renforcé par l'action des acides aliphatique à court chaines formé lors a dégradation bactériennes des fibres solubles (propionate, butanoate...): ils provoquent des contractions physique de l'iléon et inhibent les contractions coliques non propulsives (BRUNETON, 2009; KENDALL *et al.*, 2012). Ainsi ces fibres jouent un rôle dans la prévention contre un cancer colorectal. Plusieurs mécanisme sont proposés pour explique cette apparente action protectrice : par dilution des toxiques en augmentant le volume fécal : accélération du transit, d'autre part par l'abaissement de pH du colon (ce qui insolubilise des acides biliaires) et exercent, au moins in vitro une action complexe sur les cellules coliques (BROWNLEE, 2011; MAXWELLA *et al.*, 2016).

D'autre part, de nombreux étude épidémiologiques et cliniques montrent que l'apport des fibres alimentaires peut abaisser efficacement les risques des maladies comme le diabète (LIU *et al.*, 2015). Dont une supplémentation en fibres solubles (de la gomme guar ou des pectines) réduit la vitesse d'absorption intestinale du glucose (BRUNETON, 2009).

Une action hypocholestérolémiant est noté dans plusieurs études : la viscosité des fibres solubles agissent négativement sur le transport et le métabolisme du cholestérol : en formant un gel, les fibres ont un effet séquestrant sur diverses molécules, notamment sur les stérols et acides biliaires. Ces derniers étant moins disponibles, la formation des micelles nécessaires à l'absorption des lipides diminue, de plus, étant moins réabsorbés, ils sont davantage synthétisés à partir du cholestérol. On a également l'inhibition de la synthèse hépatique du cholestérol par les acides gras à court chaines libérés par la dégradation bactérienne des fibres dans le colon (KENDALL *et al.*, 2012).

Chez l'homme, les études prospectives de cohorte prouvent de façon solide que l'apport régulier de fibres est inversement corrélé au risque d'accident cardiovasculaire et coronarien en abaissant la pression systolique, et la pression diastolique (KACZMARCZYK, 2012).

I.1.4.- Polysaccharides bioactifs des autres sources

Les glycosamino-glycanes sulfatés tels que l'héparine, le sulfate d'héparane (HS), le sulfate de chondroïtine (CS), le sulfate de dermatane (DS), et la kératine sulfate représentent un autre groupe de polysaccharides bioactifs qui sont principalement issues d'animaux. Ces polymères sont constitués de résidus neutres (glycosamine) et acides (acide glucuronique et/ou acide iduronique) plus ou moins sulfatés, unis par des liaisons glycosidiques de type α -(1→4), β -(1→4) ou β -(1→3) (VIVES, 2011). L'héparine est utilisé dans le traitement curatif et préventif des maladies thromboemboliques (MURRAY *et al.*, 1999). L'activité anticoagulante de l'héparine est liée fortement de sa structure spécifique, dans lequel le site de fixation de l'antithrombine III est crucial pour que l'héparine empêche la génération d'un caillot de fibrine qui est formée par l'action de la thrombine.

Les recherches ont montré que Le sulfate de chondroïtine (CS) et le sulfate de dermatane (DS) sont des molécules clés dans la matrice extracellulaire du cerveau par régulation de l'adhérence cellulaire et la prolifération et la migration au cours de la cicatrisation (SUGAHARA *et al.*, ZOU *et al.*, 2004).

La chitine, le second polymère le plus abondant après la cellulose, est un polymère constitué de N-acétyl-glucosamine (unité acétylée) et N-glucosamine (unité désacétylée) lié par une liaison β - (1-4). La désacétylation de la chitine dans des conditions alcalines donne le plus important dérivé de la chitine, chitosane. Oligomères de l'hydrolyse acide partielle de la chitine et le chitosane sont reconnus par leur activités biologique, effet anti-inflammatoire, antitumoral , antibactérienne et des propriétés fongicides... etc (LIU *et al.*, 2015).

Chapitre II.-

Méthodologie de travail

II.1.- Principe de l'étude

L'étude porte sur l'extraction des polysaccharides hydrosolubles issus de la gomme *Commiphora myrrha*. Ainsi, l'extrait de polysaccharide est caractérisé partiellement par des méthodes colorimétriques, à savoir la détermination des teneurs en oses totaux, neutres, acides uroniques et en protéines. De même, une analyse qualitative des résidus glycosidiques constitutifs après hydrolyse par chromatographie sur couche mince est effectuée.

Cette étude vise aussi les propriétés biologiques dont les activités anti- diabétique, anti-oxydantes et phagocytaires.

II.2.- Choix de la plante

Commiphora myrrha appartient au genre *Commiphora* de la famille des Burseraceae, est un petit arbre ou un grand arbuste d'une hauteur d'environ 3 m, avec de nombreuses courtes branches épineuses (SHEN *et al.*, 2012). Se trouve en abondance dans le Sud de l'Arabie Saoudite et l'Afrique du Nord (principalement la Somalie et l'Éthiopie) au Sud jusqu'à au Nord-Est du Kenya (HANUS *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2012). *Commiphora myrrha* est caractérisé par la production de la *myrrhe*, qui est une gomme-résine aromatique s'écoule naturellement ou par incision du tronc (SU *et al.*, 2011). Cette gomme-résine est constituée d'un mélange complexe de différents composés chimiques tels que les lignanes, les lipides, les diterpénoïdes, les stéroïdes, polysaccharides ... etc (SU *et al.*, 2011).

Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies; comme l'aménorrhée, la dysménorrhée, douleurs, les tumeurs, la fièvre, les affections pulmonaires, les morsures des serpents et scorpions, et les infections de la peau dans l'Inde ancienne, la Chine, Rome, la Grèce, et de Babylone. Surtout, la myrrhe est un analgésique commun et a été utilisé pour les plaies de plus de 2000 ans, jusqu'à ce que l'Europe ait découvert la morphine (SU *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2012). Ainsi elle est utilisé comme anti diabétique (ALI-SHTAYEH, *et al.*, 2012).

SU *et al.* (2011) ont montré que l'extrait d'éthanol de la gomme de *Commiphora myrrha* a une activité anti-inflammatoire et analgésique.

De nombreuses études ont été réalisées sur les huiles essentiels et la résine de la gomme *Commiphora myrrha* et leurs activités biologiques, tandis qu'aucune étude n'a été signalé sur les polysaccharides de *Commiphora myrrha* (TIPTON *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2012).



Photo 01.- Gomme de *Commiphora myrrha*

II.3.- Matériel de l'étude

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

II.3.1.- Produits et appareillage

Les solvants et les réactifs utilisés sont indiqués dans le tableau 1. L'origine et le type d'appareils sont présentés dans le tableau 2.

II.3.2.- Matériel biologique

Le matériel biologique regroupe la gomme *Commiphora myrrha* (Nees), du sang humain, et de *Candida albicans*.

La Myrrhe est récoltée au Sahara algérienne dans la région de Tamanrasset, est utilisée couramment dans la médecine traditionnelle des régions du sud algérienne.

Le sang humain est prélevé à partir de volontaires sains de sexe masculin, âgé de 20 à 50 ans selon XI *et al.* (2012), le jour même de son utilisation au laboratoire IBN ROCHD de Ghardaïa (Algérie). L'absence d'antigène HBs, d'anticorps anti-VIH et d'anticorps anti-VHC, est aussi vérifiée. Le groupage sanguin de chacun des individus, est confirmé.

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	Densitég/cm ³	Pureté%
Acétone	GPR RECTAPUR	Liquide	C ₃ H ₆ O	58,08	0,792	100
Acide acétique	EDEN-LABO	Liquide	CH ₃ COOH	60,05	1,048-1.051	99,5
Acide chloro- hydrique	SIGMA-ALDRICH	Liquide	HCl	36,46	1,19	37
Acide ortho-phosphorique	SIGMA-ALDRICH	Liquide	H ₃ PO ₄	98	1,69	85-88
Acide tri-fluoro-acétique	SIGMA-ALDRICH	Liquide	CF ₃ COOH	114,02	1,49	99,8
Aniline	RECTAPUR	Liquide	C ₆ H ₅ NH ₂	93,13g	1,02-1.03	98,5
Bicarbonate de sodium	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	NaCH ₃	84,01	/	99,5
Butanol	SIGMA ALDRICH	Liquide	C ₄ H ₉ OH	74,12	81	99,9
Chloroforme	SCHARLAU	Liquide	CHCl ₃	119,38	1,47	99-99,6
Chlorure de calcium	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	CaCl ₂	110,98	2,15	99,9
Chlorure de magnésium	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	MgCl ₂	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	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C ₁₂ H ₁₁ N	169,23	52,5-54,5	98
DPPH	ALDRICH	Poudre	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₅	394,0	/	/
Ether de pétrole	SIGMA-ALDRICH	Liquide	/	/	/	95,0
Chlorure de fer ferrique hexahydraté	VWR PROLABO	Poudre	C ₁₃ Fe ₆ H ₂ O	270,30	/	/
Isopropanol	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C ₄ H ₈ O	60,10	0,803 -0,805	99,5
Méthanol	SCHARLAU	Poudre	CH ₃ OH	32,04	0,79	99,9
Sulfate de cuivre (II) pentahydraté	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	CuSO ₄ , 5H ₂ O	249,68	/	/
Phénol	FLUKA CHEMIK	Poudre	C ₆ H ₆ O	94,11	/	90,0
Phosphate de potassium dibasique	BIOCHEM	Poudre	KH ₂ PO ₄	136,09	2,338	99,5
Phosphate disodiquedihydraté	BIOCHEM	Poudre	Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	177,99	1,63	99,5
Pyridine	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C ₅ H ₅ N	79,10	/	99,5
Rouge phénol	BIOCHEM	Poudre	C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S	354,38	/	98-100
Sérum Albumine Bovine (BSA)	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	/			
Tartrate de sodium et de potassium tétrahydraté	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	KNaC ₆ H ₆ O ₆	282,22	/	98,0
TPTZ	SIGMA-ALDRICH	Poudre	C ₁₉ H ₁₂ N ₆	312,33	/	99,0
Trolox	ALDRICH	Poudre	/	250,29	/	97,0

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

Appareil	Fournisseur	Type	Lieu de fabrication
Agitateur magnétique	VELP CSIENTIFICA	F20520162	EUROPE
Autoclave	WEBECO	WEBECKE. P : 2.5BAR, T : 138oC	/
Bain marie	MEMMERT	MEMMERTGMBH. WB 7. NENNTEMP ; 100 0C	GERMANY
Bain marie avec agitation	MEMMERT	MEMMERTGMBH. NENNTEMP;95 0C	GERMANY
Balance	OHAUS	DISCOVERY DV 215CD OHAUS.	USA.
Centrifugeuse	SIGMA	SIGMA. 15PK, 14000 RPM.	GERMANY
Distillateur	LABORTECHNIC	D30-BURGWEDL, 2108	GERMANY
Etuve	MELAG	MELAG815.220V, 50HZ, 12.3A, 2700w.	GERMANY
Hotte	TEL STAR	TELSTAR AV-100. MODELE50/60 HZ, 0.6KW.	SPAIN
Lyophilisateur	CHRIST	CHRIST.ALPHA 1-2LD. 101021.230V, 50HZ, 0.7. KW.	GERMANY
Micropipette	SOCOREX	ACURA 821. 200-1000ML	SWIS
PH mètre	WTW	WTW.D-82362. PH 1970.	GERMANY
Spectrophotomètre	SHIMADZU	UV-MINI-1240.UV-VIS SPECTROPHOTOMETRE	CHINA

II.4.- Etude des polysaccharides

L'étude porte sur l'extraction des polysaccharides, la composition chimique des extraits de polysaccharides hydrosolubles, le dosage et l'identification des résidus glycosidiques et enfin mesure de leurs activités biologiques.

II.4.1.- Extraction des polysaccharides de la gomme-résine de *Commiphora myrrha*

Une quantité de 10 g du broyat séché est prétraitée par 100 ml d'éthanol à 96%, en mettant à reflux pendant 3 h sous agitation et à 95°C, afin d'éliminer les composés lipophiles et les pigments ainsi les composés de faible poids moléculaire, les polyphénols, les oligosaccharides, les oses simples et les acides aminés (GUO *et al.*, 2016). Après centrifugation (BECKMAN COULTER, JLA-16.250 MAX 16000 RPM), à 10000 g/15 min à la température ambiante, le surnageant est conservé à 4°C (SINGTHONG *et al.*, 2009). Tandis que, le marc prétraité est séché à 50°C à l'étuve (JOUAN) pendant une nuit, puis pesé (GUO *et al.*, 2016). Une quantité de 1 g de marc séché, est macéré dans 100 ml d'eau distillée chaude à 80°C pendant 2 h et sous agitation à pale (250 rpm, STUART) (XIE *et al.*, 2014; QIAN *et al.*, 2011). Le mélange est centrifugé à 10000 g/20 min à la température ambiante. Le surnageant est filtré à travers des filtres de Diatomé sur de verre fritté, puis l'extrait est passé dans un filtre GVS de 5,0 µm et 2 filtres Chromafil de 0,45 µm (SHI *et al.*, 2012). Trois volumes d'éthanol 96% froide (-20°C) sont ajoutés au filtrat (SCHEPETKIN *et al.*, 2008; AI *et al.*, 2012). Aucun précipité n'a été remarqué sauf que l'extrait est translucide. La solution est laissée 24 h à -20°C. Après centrifugation à 10000 g/15 min à la température ambiante (Thermo Science, HERAEUS BIOFUGE PRIMO R) (SINGTHONG *et al.*, 2009); aucun précipité n'a été signalé. La solution est concentrée au 1/10 du volume initial, dans le rotavapor (BUCHI, Rotavapor R II) (AI *et al.*, 2012). Trois volumes d'acétone sont ajoutés au concentrât, dont il est remarqué l'apparition d'un précipité grisâtre. La solution est conservée à -20°C pendant 24 h, puis centrifugée à 10000 g/15 min à la température ambiante (SINGTHONG *et al.*, 2009). Le culot est lavé 3 fois par l'acétone (AI *et al.*, 2012); puis séché à l'étuve à 50°C (HERLINA *et al.*, 2016).

A la fin, le culot est récupéré puis lyophilisé (CAI *et al.*, 2016). Le lyophilisat obtenu représente l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles (HE *et al.*, 2014).

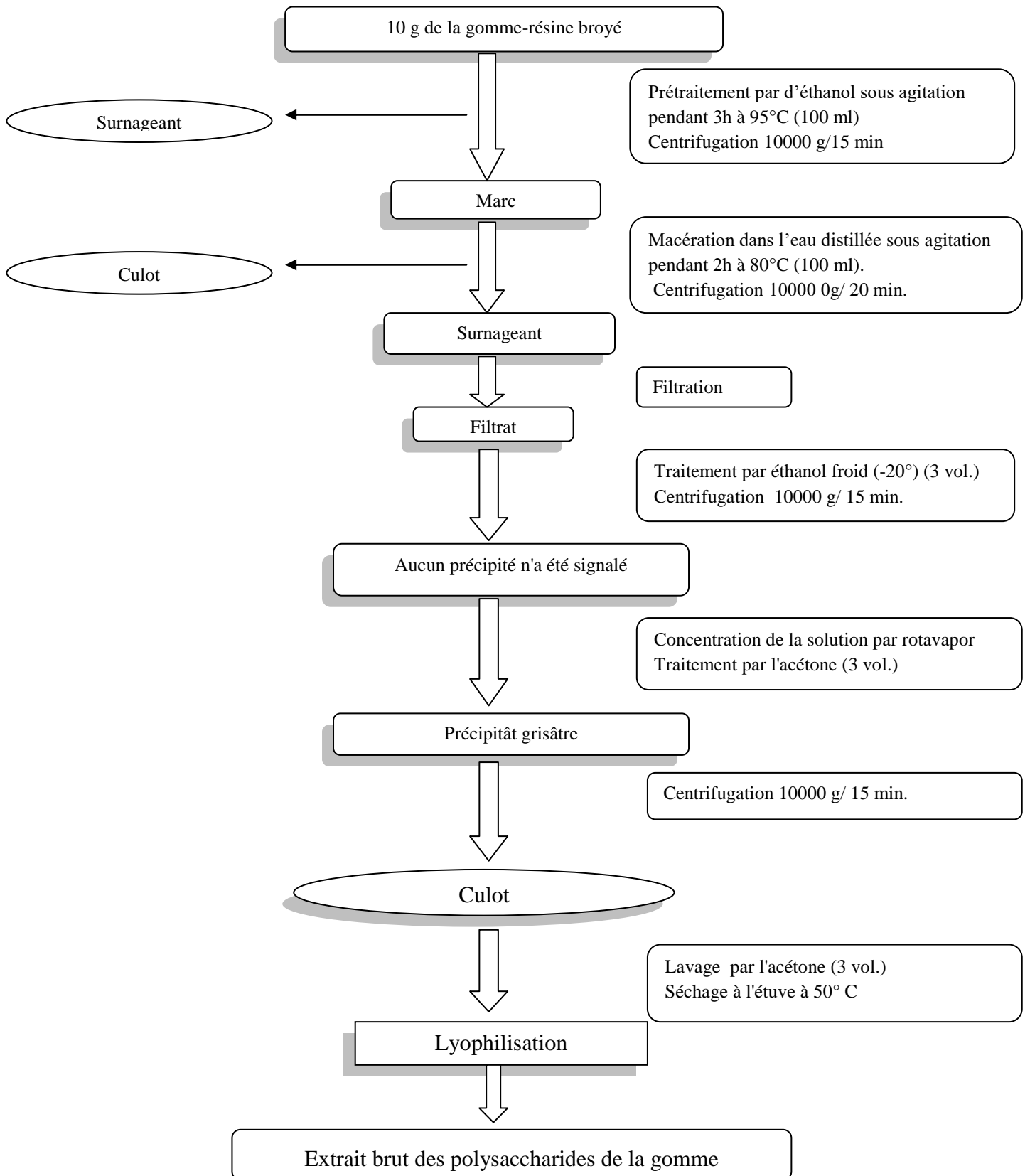


Figure 01.- Différentes étapes d'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la gomme *Commiphora myrrha* selon GUO *et al.* (2016); XIE *et al.* (2014); QIAN *et al.* (2011); SHI *et al.* (2012); SCHEPETKIN *et al.* (2008); AI *et al.* (2012); SINGTHONG *et al.* (2009), CAI *et al.* (2016).

II.4.2.- Compositions de l'extrait brut des polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha*

L'étude de la composition de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles consiste à déterminer les teneurs en oses totaux, oses constitutifs neutres et acides, et la teneur en protéines. Ceci par des réactions colorimétriques. Les analyses sont répétées trois fois.

II.4.2.1.- Dosage des oses totaux

La teneur en oses totaux dans l'extrait brut polysaccharidique de la gomme *Commiphora myrrha* est déterminée selon la méthode DUBOIS *et al.* (1956). Les oses sont stables en milieu acide. Cependant s'ils sont chauffés en milieu acide concentré, ils donnent des furfuraldéhydes par cyclisation et déshydratation. Les furfurals et ses dérivés ont la propriété de se condenser avec le phénol pour former des complexes jaunes-orangés. L'apparition de ces complexes est suivie en mesurant l'absorbance à 490nm qui permet de déterminer la concentration en oses totaux de l'échantillon analysé en se référant par projection à une courbe d'étalonnage $DO=f(c)$ dont le glucose est utilisé comme étalon (BRUDIEUX, 2007) (Annexe 01).

II.4.2.1.1.- Préparation des réactifs et des solutions

➤ Préparation de la solution mère de l'extrait polysaccharidique 0,01%

La solution est préparée avec 10 mg de l'extrait brut polysaccharidique lyophilisé dans 100ml d'eau distillée.

➤ Préparation de la solution mère de glucose 0,01%

La préparation est effectuée par 0,01g du glucose dans 100ml d'eau distillée.

➤ Préparation de la gamme étalon de glucose 0,001% à 0,01% (DUBOIS *et al.*, 1956)

Tableau 03.-Gamme étalon du glucose

	Blanc	0,001%	0,002%	0,005%	0,008%	0,01%
Eau distillée (ml)	1	0,9	0,8	0,5	0,2	0
Glc 0,01% (ml)	0	0,1	0,2	0,5	0,8	1
Concentration (mg.l ⁻¹)	0	10	20	50	80	100

➤ **Préparation de la solution du phénol 5%**

La solution est préparée avec 1g du phénol dans 20ml d'eau distillée selon la méthode de DUBOIS *et al.* (1956) modifiée.

II.4.2.1.2.-Mode opératoire

La teneur en oses totaux est déterminée par la méthode de DUBOIS *et al.* (1956) avec des modifications selon BRUDIEUX (2007).

- Dans des tubes à essai en verre, introduire 200 µl de la solution polysaccharidique, ainsi que 200 µl des solutions du glucose constitutive de la gamme d'étalonnage;
- Additionner 200 µl de la solution du phénol à 5%;
- Agiter le mélange;
- Ajouter rapidement 1ml d'acide sulfurique concentré au milieu réactionnel,
- Faire chauffer le mélange au bain Marie à 100 °C pendant 5 min;
- Après refroidissement dans un bain de glace, placer dans l'obscurité pendant 30 min;
- Lire la densité optique à 490 nm contre le blanc par un spectrophotomètre UV-Visible.

II.4.2.2.- Dosage des oses neutres

Le dosage des oses neutres se repose sur la réaction des dérivés furfuriques obtenus par action à chaud d'un acide concentré comme l'acide sulfurique, en présence d'un composé aromatique, le résorcinol (1,3-dihydroxybenzène), donnant des composés de couleur orangée. L'Absorbance est mesurée à 480nm et les quantités des oses en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon du glucose de concentration 0,001% à 0,01% (MONSIGNY *et al.*, 1988; DUBOIS *et al.*, 1956) (Annexe 02).

II.4.2.2.1.- Préparation des réactifs et solutions

- **Préparation de la Gamme étalon du glucose 0,001% à 0,01%** (WARRANT, 2004)

➤ **Tableau 04.-** Gamme étalon de glucose

	Blanc	0,001%	0,002%	0,005%	0,008%	0,01%
Eau distillée (ml)	1	0,9	0,8	0,5	0,2	0
Glc 0,01% (ml)	0	0,1	0,2	0,5	0,8	1
Concentration (mg.l ⁻¹)	0	10	20	50	80	100

➤ **Préparation de la solution du résorcinol 0,6%**

La solution est préparée avec 0,3g du résorcinol dans 50ml d'eau distillée selon la méthode de MONSIGNY *et al.* (1988) modifiée.

II.4.2.2.2.- Mode d'opérateur

- Introduire, dans des tubes à essai en verre 200 µl de la solution polysaccharidique ou de l'étalon;
- Ajouter 200 µl de la solution du résorcinol à 0,6%;
- Après l'agitation de mélange, ajouter rapidement 1ml d'acide sulfurique;
- Faire chauffer le mélange au bain Marie à 90 °C pendant 30 min;
- Après refroidissement dans un bain de glace, placer les échantillons dans l'obscurité pendant 30 min;
- La densité optique est mesurée à 480 nm contre le blanc par un spectrophotomètre UV-Visible.

II.4.2.3.- Dosage des oses acides

Le principe de dosages repose sur la condensation, par estérification, d'un chromogène avec les produits de déshydratation acides uroniques (BRUDIEUX, 2007).

En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent en acide 5-formylfuroïque. Les chromophores ainsi formés absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité de sucres présents. Le méta-hydroxydiphényle en présence de tétraborate de sodium a été utilisé comme chromophore sélectif lors du dosage des acides uroniques. Les complexes formés de couleurs rose-rouge absorbent à 520 nm qui permettent de déterminer les concentrations en oses acides en comparaison de l'échantillon analysé en se référant par projection à une courbe d'étalonnage $DO=f(c)$ dont l'acide glucuronique est utilisé comme étalon (BRUDIEUX, 2007) (Annexe 03). Cette méthode est décrite par BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1973).

II.4.2.3.1.- Préparation des réactifs et des solutions

➤ **Préparation de la solution mère d'acide glucuronique 0,01%**

La préparation est effectuée par 10 mg d'acide glucuronique dans 100 ml d'eau distillée.

➤ Préparation de la gamme étalon de l'acide glucuronique de 0,001% à 0,01%

Tableau 05.- Gamme étalon d'acide glucuronique

	Blanc	0,001%	0,002%	0,005%	0,008%	0,01%
Eau distillée (ml)	1	0,9	0,8	0,5	0,2	0
Glc A. 0,01% (ml)	0	0,1	0,2	0,5	0,8	1
Concentration (mg.l ⁻¹)	0	10	20	50	80	100

• Solution A

Dans bain de glace et avec agitation magnétique, une quantité de 0,095g de tétraborate de sodium (Na₂B₄O₇, 10H₂O) à 0,0125 est ajouté à 20 ml d'acide sulfurique. Cette solution est conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

• Solution B

Une quantité de 40mg de NaOH est dissous dans 8ml d'eau distillée, puis 12 mg de m-HDP est ajouté. Cette solution est conservée à 4°C.

II.4.2.3.2.- Mode d'opérateur

- Ajoute 1,2 ml d'une solution de tétraborate de sodium à 0,125M dans l'acide sulfurique concentré à 200 µl de solution polysaccharidique à doser;
- Après agitation, incuber les tubes dans un bain la glace pendant 5min;
- Porter les échantillons à 100°C au bain-marie durant 5 min;
- Ajouter 20 µl d' m-HDP (métahydroxydiphényle);
- Après agitation, une coloration rose se développe pendant 5 min;
- Réaliser la lecture des densités optiques à 520 nm.

II.4.2.4.- Dosage des protéines

Les teneurs en protéines sont déterminées selon deux méthodes : LOWRY et BRADFORD.

II.4.2.4.1.- Dosage des protéines selon la méthode de LOWRY

L'addition successive à une solution protéique diluée d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu donne une coloration bleue foncée. Celle-ci résulte de la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine en hétéro-polymolybdène (TOURATIER, 1992). Les espèces réduites absorbent à 750 nm. A cette longueur d'onde, le

spectrophotomètre donne une valeur de densité optique (DO) qui permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé en se référant par projection à une courbe d'étalonnage $DO=f(c)$ où l'albumine sérique bovine commerciale est utilisée comme protéine étalon (LE ROUX, 2012) (Annexe 04).

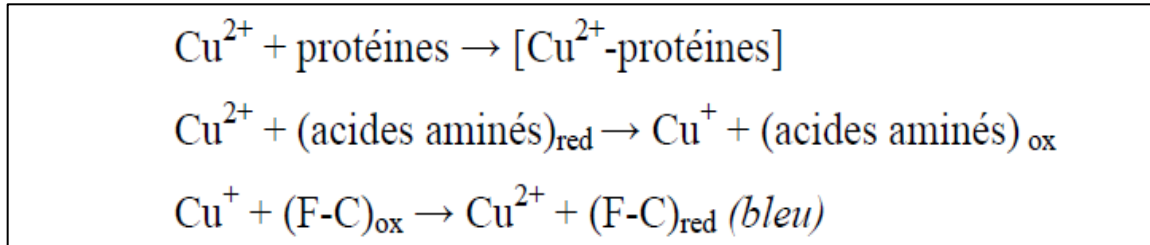


Figure 02.- Equation de la réaction (LE ROUX, 2012).

II.4.2.4.1.1.- Préparation des réactifs et des solutions

- **Préparation de la solution mère de sérum albumine bovine (BSA) 0,1%**

La solution est préparée avec 0,1g de BSA dans 100 ml d'eau distillée.

- **Préparation de la gamme d'étalonnage de sérum albumine bovine (BSA) 0,01% à 0,1%** (LOWRY *et al.*, 1956)

Tableau 06.- Gamme d'étalonnage de sérum albumine bovin

	Blanc	0,01%	0,02%	0,05%	0,08%	0,1%
Eau distillée (ml)	1	0,9	0,8	0,5	0,2	0
BSA 0,1% (ml)	0	0,1	0,2	0,5	0,8	1
Concentration (mg.l ⁻¹)	0	100	200	500	800	1000

- **Réactif A alcaline:** Préparer une solution de 1g de Na₂CO₃ dans 50ml d'eau distillée, puis ajouter 50ml d'une solution de NaOH de 0,1N.
- **Réactif B cuivrique:** Mélanger une solution de 0,05g de CuSO₄ dans 10ml, avec une solution de 0,1g de tartarate de sodium dans 10ml.
- **Réactif C** (solution alcalin de cuivre): Prendre 50ml du réactif A et le mélanger avec 1ml du réactif B.

II.4.2.4.1.2.- Mode opératoire

Le dosage est effectué selon la méthode modifiée de LOWRY *et al.*, (1951) qui est utilisé pour des quantités des protéines de 20 à 100 µg :

- Introduire dans des tubes à essai en verre, 400 µl de l'échantillon ;
- Ajouter 2ml de la solution de LOWRY et 200 µl du réactif Folin –Ciocalteu;
- Après agitation pendant 10min, placer les tubes à l'obscurité pendant 30min;
- Faire le lecteur à 750nm par un spectrophotomètre UV-Visible.

II.4.2.4.2.- Dosage des protéines selon la méthode de BRADFORD

Le dosage de protéines par la méthode de Bradford (1976) utilise le réactif éponyme, dont le constituant principal est le bleu de Coomassie. Sous sa forme cationique libre, ce réactif absorbe la lumière à une longueur d'onde de 465nm. Lorsqu'il est mis en contact avec une solution protéique à doser, il se lie aux protéines présentes: les chaînes latérales des acides aminés basiques et aux groupements aromatiques ce qui a pour effet de déplacer sa principale raie d'absorption à 595nm (fig.03). L'absorbance du rayonnement visible à 595nm est mesurée par un détecteur, et permet de doser indirectement la teneur en protéine de la solution à l'aide d'une courbe d'étalonnage en l'albumine sérique bovine (BSA) (LE ROUX, 2012) (Annexe 05). Cette méthode est de détection de l'ordre 0.2 µg à 20 µg (LE ROUX, 2012; WARRND, 2004).

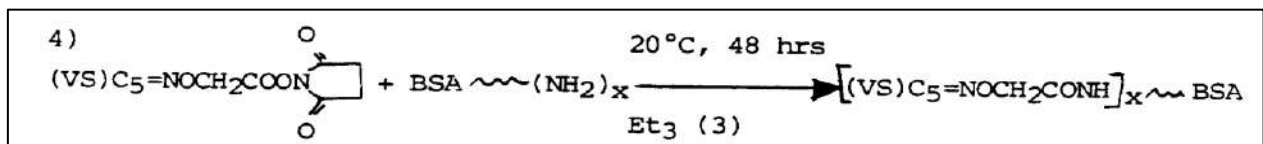


Figure 03.- Equation de la réaction

II.4.2.4.2.1.- Préparation des réactifs et des solutions

- **Préparation de la solution mère de sérum albumine bovine (BSA) 0,01%**

La solution est préparée avec 0,01g de BSA dans 100 ml d'eau distillée.

- **Préparation de la gamme étalon de BSA 0,001% à 0,01%(BRADFORD, 1976)**

Tableau 07.-Gamme d'étalonnage de sérum albumine bovin

	Blanc	0,001%	0,002%	0,005%	0,008%	0,01%
Eau distillée (ml)	1	0,9	0,8	0,5	0,2	0
BSA 0,01% (ml)	0	0,1	0,2	0,5	0,8	1
Concentration (mg.l ⁻¹)	0	100	200	500	800	1000

➤ **Préparation de la solution de bleu de Coomassie**

- ❖ Dissoudre 25mg du Bleu de Coomassie dans 12,5 ml d'éthanol.
- ❖ Ajouter 25ml d'acide phosphorique.
- ❖ Diluer la solution obtenue à un volume finale de 250ml.

II.4.2.4.2.2.- Mode opératoire

Le dosage est effectué selon la méthode micro BRADFORD (1976) adopté:

- Introduire 200µl de l'échantillon ou l'étalon dans des tubes à essai en verre;
- Ajouter 2ml de bleu de Coomassie;
- Après agitation, faire chauffer les échantillons au bain Marie à 37°C pendant 30 min;
- Ensuite après refroidissement à température ambiante pendant 20min, lire la densité optique à 595nm par un spectrophotomètre UV-Visible.

II.4.2.5.- Dosage des polyphénols

Les teneurs en phénols totaux des extraits sont déterminées au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode adoptée de SINGLETON et ROSS (1965).

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique : acide gallique, permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait (CHAABI, 2008) (Annexe 06).

II.4.2.5.1.- Préparation des réactifs et des solutions

- **Solution mère d'acide gallique** : 100mg d'acide gallique dans 100 ml.
- **Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1/10**
- **Solution carbonate de sodium à 20%** : 12g de carbonate de sodium dans 60ml.
- **Préparation de la gamme d'étalon d'acide gallique 0,05% à 0,35%**

Tableau 8.- Gamme étalon de l'acide gallique

	Blanc	0,05%	0,10%	0,15%	0,20%	0,25%	0,30%	0,35%
Eau distillée (µl)	1	95	90	85	80	75	70	65
AG 0,1% (µl)	0	5	10	15	20	25	30	35
Concentration (mg.l ⁻¹)	0	50	100	150	200	250	300	350

II.4.2.5.2.- Mode opératoire

- Introduire un volume de 100 µl de l'échantillon dans des tubes à essais en verre;
- Ajouter 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1/10;
- Agiter les tubes sont agités et incubés durant 2 min;
- Ajoute de 2 ml de carbonate de sodium à 20%;
- Mettre immédiatement les tubes à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante;
- Lire la densité optique à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-Visible.

II.4.3.-Caractérisation des résidus glycosidiques

L'identification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques (RUIZ, 2005) et les monosaccharides libérés sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM).

II.4.3.1.-Hydrolyse acide des liaisons glycosidiques

II.4.3.1.1-Principe

L'hydrolyse acide est basé généralement sur l'utilisation de l'acide chlorhydrique, de l'acide sulfurique ou de l'acide trifluoroacétique (TFA) à des températures élevées (MORRISON, 1988).

Les différents types de liaisons osidiques présentent des taux d'hydrolyse variables en fonction de la stabilité relative des liaisons ($1,6' > 1,4' > 1,3' > 1,2'$). De même, la nature des liaisons glycosidiques entre deux unités osidiques présente une différence de stabilité par rapport au cas usuel de deux unités glucosidiques liées en 1,4'. Les liaisons glycosidiques entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique ou amine seront plus difficiles à rompre que des liaisons entre un ose et un autre sous la forme furanose, anhydro ou deoxy (DELATTRE, 2005).

Le TFA est devenu l'acide de choix pour la plupart des analyses de glucides en raison de son efficacité à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques sans causer des destructions massives des composants de monosaccharides résultant et en raison de sa volatilité, ce qui minimise son interférence avec les procédures ultérieures comme l'analyse par HPAEC-PAD (RUIZ, 2005 ;JOHANSSON *et al.*, 2006).

Il est à noter que les hydrolyses acides sont difficilement contrôlables car la rupture des liaisons osidiques est aléatoire et mène dans la majorité des cas à la production importante de monosaccharides. De ce fait, les voies de dégradation acide sont largement exploitées en

vue de déterminer la structure et la composition des oses constitutifs des polysaccharides après dépolymérisation totale (DELATTRE, 2005).

II.4.3.1.2-Mode opératoire (JOHANSSON, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2016)

Le mode opératoire adopté est le suivant:

- Utiliser des flacons à vis de petit volume nettoyé et séché;
- Peser dans les flacons 15 mg de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles;
- Ajouter 1 ml d'acide trifluoroacétique 2M;
- Chauffer à 110C° à l'étuve;
- Récupérer les flacons de l'étuve après 4h;
- Refroidir les flacons au bain de glace;
- Verser l'hydrolysate dans l'Eppendorf étiqueté;
- Centrifuger l'hydrolysate à 10000g pendant 10min;
- Récupérer le surnageant dans des boites de Pétri de petit volume;
- Ajouter quelques gouttes de méthanol;
- Déposer les boites de Pétri dans un dessiccateur sous vide pendant 24heures;
- Après évaporation et séchage total de l'hydrolysate, ajouter 1ml de l'eau distillée;
- Récupérer les hydrolysats dans des Eppendorfs de 1,5ml.

II.4.3.2.-Chromatographie sur couche mince

II.4.3.2.1-Principe

La chromatographie sur couche mince (C.C.M) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progressent le long d'une phase stationnaire (gel de silice, polyamide, cellulose...) fixée sur une plaque de verre ou sur feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile (DELATTRE, 2005). Donc les substances vont migrer à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant .Chacun des constituants est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire. L'équilibre qui en résulte entre la force de rétention et d'entraînement aboutit à une migration

différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation et en comparaison aux étalons, leur identification (DELATTRE, 2005).

II.4.3.2.1-Mode opératoire

Quatre systèmes de séparation (1, 2,3 et 4), sont utilisés pour des plaques en gel de silice (HOTON-DORGE, 1976; HAN et ROBYT, 1998; CHENG *et al.*, 2010). Le choix du système est en fonction de la nature des oses à séparer et les rapports frontaux obtenus. Le Nigrum est utilisé comme révélateur pour les systèmes en gel de silice (GHEBREGZABEIER *et al.*, 1975).

➤ Phases mobiles

Pour le système 1, la phase mobile est constituée d'acétate d'éthyle, pyridine, eau, n-butanol, acide acétique dans les proportions 5-4-4-10-2 (HOTON-DORGE, 1976).

Pour le système 2, la phase mobile est constituée de: Chloroforme, n-butanol, méthanol, acide acétique, eau (4,5-12,5-5-1,5-1,5) (CHENG *et al.*, 2010).

Pour le troisième système, la phase mobile est constituée de : Butanol, éthanol, eau avec les proportions suivantes : 4-1-5(BISHT *et al.*, 2013).

Pour le quatrième système, la phase mobile est constituée de : Acétonitrile, acétate d'éthyle, propanol, eau avec les proportions suivantes : 8,5-2-2-1,5 (HAN et ROBYT, 1998).

➤ Phase stationnaire

Des plaques en gel de silice prêtes à l'emploi, sont utilisées comme phase stationnaire, sont de type Silica gel 60 F 254 de 0,25 mm d'épaisseur, sur feuille d'aluminium (WANG et FANG, 2004).

➤ Préparation des plaques chromatographiques

Une ligne de dépôt est tracée à 1,5 cm du bord inférieur des plaques, puis sont activées dans l'étuve à 100°C pendant 10 mn. Une fois activées, les plaques sont prêtes pour le dépôt des échantillons (BOUAL, 2011).

➤ Préparation des cuves chromatographique

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.

➤ Préparation du NIGRUM

Comme révélateur des spots spécifiques des glucides, le réactif du Nigrum est utilisé (PAULSEN *et al.*, 2002). La préparation de la solution se fait selon GHEBREGZABEIER *et al.* (1975) :

➤ Tous d'abord la préparation de deux solutions A et B :

A : 2g de diphénylamine dans 50 ml d'acétone dans l'agitateur.

B : 48 ml d'acétone complété jusqu'à 50 ml par l'aniline.

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

➤ Dépôt des hydrolysats et étalons

A chaque 10 mg de glucide étalon (arabinose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, xylose, fructose, acide galacturonique, acide glucuronique, N-acétylglucosamine, maltose, et tréhalose) est ajouté 1ml d'eau distillée (BOUAL *et al.*, 2013).

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

➤ Développement des plaques

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 15mn (BOUAL, 2011).

➤ Calcul des facteurs de rétention

Le facteur de rétention (Rf) est calculé pour chaque spot obtenu. Ceci permet la détermination de la composition des extraits en monosaccharides (DAVID et HAZEL, 1998).

$$Rf = \frac{\text{La distance parcourue par la substance}}{\text{La distance parcourue par le solvant}} \times 100$$

II.4.4.-Activités biologiques de l'extrait polysaccharidique

L'étude des activités biologiques porte sur les polysaccharides bioactifs constitutifs de la gomme *Commiphora myrrah* utilisée traditionnellement pour sa propriété pharmacologique en phytothérapie.

La présente étude, s'intéresse particulièrement à l'activité anti-diabétique, anti-oxydante et phagocytaire des polysaccharides issus de la gomme *Commiphora myrrah*.

II.4.4.1.-Activité anti-diabétique

Le diabète, communément appelé le diabète sucré, est une maladie métabolique qui se traduit par une hyperglycémie chronique (MOREL *et al.*, 2012) résultant d'un défaut de la sécrétion ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées. L'hyperglycémie chronique est associée à terme avec des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux (DROUIN *et al.*, 1999). Les traitements couramment utilisés par voie orale peut être subdivisée en deux types : les médicaments hypoglycémisants (sulfonylurées et dérivés de l'acide benzoïque) et les agents anti-hyperglycémiques (biguanides, les inhibiteurs de l'enzyme α -D-glucosidase et thiazolidinediones) (BISHT *et al.*, 2013).

α -D-glucosidases des mammifères, situés au niveau de bordure en brosse à la surface de la membrane des cellules intestinales, est l'enzyme clé catalysant la dernière étape dans le processus digestif des glucides. Par conséquent, des inhibiteurs de l' α -D-glucosidase peuvent retarder la libération du glucose à partir des glucides complexes alimentaires et retarder son absorption, ce qui entraîne une réduction du taux de glucose sanguin postprandial plasmatique et suppression de l'hyperglycémie postprandiale (ZHANG et LI, 2015).

Parmi ces inhibiteurs: l'Acarbose, Miglitol et Voglibose qui sont des inhibiteurs compétitifs de la α -D glucosidase intestinale, réduisent la glycémie postprandial en retardant la digestion et l'absorption de l'amidon et disaccharides dans le diabète sucré de type 2. Cependant ces inhibiteurs sont caractérisés par leurs effets indésirables tels que les flatulences, la diarrhée, des douleurs abdominales, une augmentation des enzymes hépatiques et de la malnutrition (BISHT *et al.*, 2013).

Les chercheurs ont découvert une grande variété des molécules actives à partir des plantes médicinales, et les polysaccharides ont fait le sujet le plus important des recherches, en tenant vue leur potentiel élevé dans le traitement de diabète sucré. WANG *et al.* (2016) ont rapporté que les polysaccharides extraits de *Morus alba* ont un effet hypoglycémiant par régulation de la voie JNK/p38 intra-pancréatique pour la protection contre l'apoptose induite par streptozotocine (STZ) dans le tissu pancréatique, ainsi l'amélioration de la fonction métabolique dans le pancréas.

CFPB et CFPA-3 sont deux polysaccharides acides issus de tégument du fruit de *Camellia oleifera*. Ces polysaccharides ont montré une activité anti diabétique par l'inhibition de l'activité l' α -glucosidase. Les concentrations IC₅₀ inhibitrices de α -D-glucosidase de CFPB et CFPA-3 sont 11,80 et 10,95 μ g/mL, respectivement (ZHANG et LI, 2015).

II.4.4.1.1.-Principe de l'étude de l'activité anti-diabétique

L'étude de l'activité anti-diabétique des polysaccharides porte sur la détermination de leur pouvoir inhibiteur de l'enzyme α -D-glucosidase.

Le test de détermination de pouvoir inhibitrice de l'enzyme α -D-glucosidase est basé sur la mesure de la libération de *p*-Nitrophénol (*p*-NP) dont l'enzyme catalyse la dégradation de *p*-Nitrophényl- α -D-glucopyranoside (*p*-NPGP) en α -D-glucopyranoside et *p*-Nitrophénol. Ce dernier absorbe à 405 nm, qui permet d'évaluer l'activité enzymatique de l' α -D-glucosidase (HA *et al.*, 2012).

En présence d'inhibiteur, l'activité enzymatique de l' α -D-glucosidase diminue ou inhibé. Cela est exprimé par diminution de la dégradation de substrat *p*-NPGP (MOSIHUZZMAN *et al.*, 2013). Dans ce test l'acarbose est utilisé comme control positif. Le contrôle négatif représente le milieu réactionnel de l'enzyme α -D-glucosidase sans aucun aditif.

II.4.4.1.2.-Préparation des solutions et réactifs

La préparation se fait selon les méthodes de BISHT *et al.* (2013); QIAN *et al.* (2015) modifiées.

➤ Préparation de la solution mère de l'extrait polysaccharidique (10mg/100 μ l)

La solution est préparée avec 10 mg de l'extrait brut polysaccharidique lyophilisé dans 100 μ l d'eau distillée.

➤ Préparation des dilutions de la solution mère de l'extrait polysaccharidique

Tableau 09.- Dilutions de la solution mère de l'extrait polysaccharidique

	Blanc	10%	25%	50%	75%	100%
Eau distillée (μ l)	20	19	15	10	05	0
Sol. mère (μ l)	0	01	05	10	15	20
Concentration (mg.ml ⁻¹)	0	10	25	50	75	100

➤ Préparation la solution de l'acarbose

Pour préparer une solution de l'acarbose de 100mM, 50 mg de l'acarbose est dissout dans 774 μ l d'eau distillée.

➤ **Préparation des dilutions de l'acarbose**

Une gamme de dilution allant de 0,01 à 100 mM est préparée à partir de la solution mère d'acarbose 100mM.

II.4.4.1.3.-Mode opératoire (BISHT *et al.*, 2013; QIAN *et al.*, 2015)

Dans un tube sec, ajouter un volume de 500µl de la solution de l'α-D-glucosidase ;

- Ajouter 10µl de l'acarbose pour le contrôle positif, de l'extrait polysaccharidique pour le test, ou de l'eau distillée pour le contrôle négatif;
- Incuber le mélange pendant 15 min à 37° C;
- Ajouter un volume de 125µl de la solution du substrat (*p*-NPG) préalablement incubé à 37° C;
- Faire agiter bien le tube pendant une minute;
- Après 2 min d'incubation, lire l'Absorbance à 405 nm et suivre la cinétique enzymatique de l'α-D-glucosidase en mesurant l'Absorbance chaque 12 sec pendant 3 min de réaction par un spectrophotomètre UV- Visible.
-

Tableau 10.- Test de l'activité anti-diabétique

		Volumes
Contrôle positif	<i>p</i> -NPG (µl)	125
	α-D-glucosidase (µl)	500
	Acarbose (µl)	10
<i>Commiphora myrrha</i>	<i>p</i> -NPG (µl)	125
	α-D-glucosidase (µl)	500
	Polysaccharides (µl)	10
Contrôle négatif	<i>p</i> -NPG (µl)	125
	α-D-glucosidase (µl)	500
	Eau distillée (µl)	10

II.4.4.2.4.-Calcul de pourcentage d'inhibition (XU *et al.*, 2014; ZANG et LI, 2015)

Le % d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{\Delta A_{\text{Contrôle négatif}} - \Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{Contrôle négatif}}}$$

$$\Delta A_{\text{Contrôle négatif}} = A_{1\text{Contrôle négatif}} - A_{0\text{Contrôle négatif}}$$

$$\Delta A_{\text{échantillon}} = A_{1\text{échantillon}} - A_{0\text{échantillon}}$$

II.4.4.2.-Activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante de l'extrait polysaccharidique de la gomme *Commiphora myrrha* est mesurée par trois tests: ABTS et DPPH.

II.4.4.2.2.-Mesure de l'activité anti-oxydante par le test d'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

II.4.4.1.2.1.-Principe du test

En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique) forme le radical $ABTS^{\bullet+}$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange (PINTO *et al.*, 2005). La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm (SCHAICH *et al.*, 2015) (Fig. 04). La méthode est généralement standardisée par rapport au TROLOX.

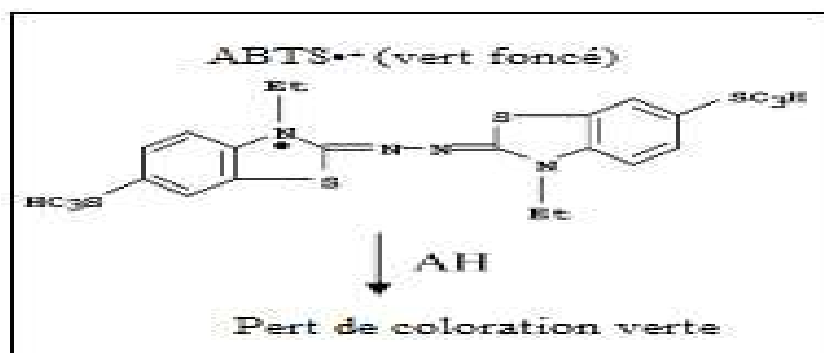


Figure 04.-Réduction du radical $ABTS^{\bullet+}$ par l'agent antioxydant (SCHAICH *et al.*, 2015)

II.4.3.2.2.2.- Préparation des solutions et des réactifs

- Préparation de la solution mère d'extrait polysaccharidique de concentration 1mg.ml^{-1} .
- Préparation de la solution mère ABTS (0,38 g ABTS poudre dissous dans 100 ml de l'eau distillée).
- Préparation de la solution de persulfate de potassium à 2,45 mM (v/v).
- Le mélange peut être laissé à température ambiante dans l'obscurité pendant 12 à 16 h avant d'utilisation. La solution $ABTS^{\bullet+}$ a été diluée avec l'éthanol pour obtenir une densité optique de $0,70 (\pm 0,02)$ à 734 nm.

II.4.4.2.2.3.-Mode opératoire

L'activité anti-oxydante de l'extrait polysaccharidique de la gomme *Commiphora myrrha* est mesurée en utilisant une méthode améliorée d'ABTS tel qu'elle est décrit par RE *et al.* (1999) ; CAI *et al.* (2004) et BIGLARI *et al.* (2008) :

- Ajouter 3,9 ml la solution d'ABTS^{•+} à 0,1 ml de la solution d'échantillon à doser avec agitation vigoureuse;
- Laisser le mélange réactionnel reposer pendant 6 min à 23 °C;
- Faire la lecture de la densité optique à 734 nm.

Trolox est utilisé en tant que standard pour le calcul de la capacité anti-oxydante de l'extrait polysaccharidique de la gomme *Commiphora myrrha*

Une courbe standard est obtenue en utilisant la solution standard de Trolox à différentes concentrations allant de 50 à 500 µM dans 80% éthanol.

II.4.4.2.2.4.-Calcul de pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition d'ABTS^{•+} est calculé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Pourcentage d'inhibition d'ABTS}^{\bullet+} = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

Où:

- A₀ représente la densité optique de contrôle ;
- A₁ représente la densité optique de l'échantillon à doser (GIESEA *et al.*, 2015).

II.4.4.2. 2.-Mesure de l'activité anti-oxydante par le test du radical 2,2'-diphenyl picrylhydrazyl (DPPH)

II.4.4.2. 2.1.-Principe du test

La réduction du radical libre 2,2'-diphenyle-1-picryl hydrazyl (DPPH[°]) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants qui comporte comme donneur d'hydrogène (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH[°] de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl-1-picryl hydrazine incolore (Fig.05).

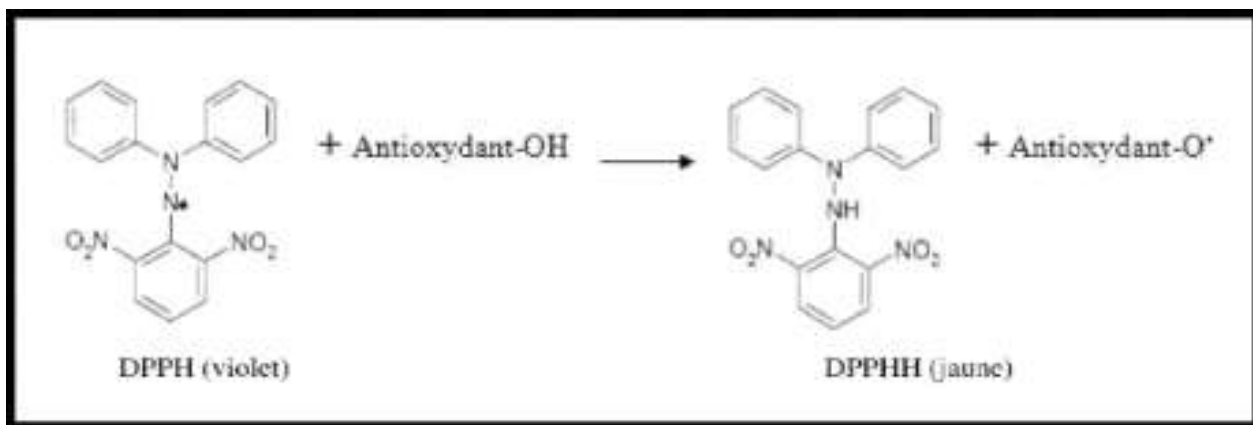


Figure 05.- Réduction de radical libre DPPH[•] par l'agent antioxydant (SCHAICH *et al.*, 2015).

II.4.4.2. 2.2.-Préparation des solutions et des réactifs

- Préparation de la solution mère d'extrait polysaccharidique de concentration 1mg.ml⁻¹.
- Une solution de 100 ml de DPPH[•] est préparée par 2,5 mg de DPPH et de méthanol (80ml) et (20ml) eau distillée à l'obscurité.
- La solution mère de DPPH concentré est diluée dans le méthanol jusqu'à l'obtention d'une densité optique proche de 1 à 515 nm (SCHAICH *et al.*, 2015).

II.4.4.2. 2.3.-Mode opératoire

L'activité anti-oxydante de l'extrait polysaccharidique de la gomme *Commiphora myrrha* est mesurée en utilisant une méthode de DPPH décrit par AMAROWICZ *et al.* (2004) et SHAOA *et al.* (2014) avec quelques modifications :

- Mélanger 100 µl de l'extrait polysaccharidique avec 3,9 ml de solution DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl);
- Agiter vigoureusement;
- Après l'incubation à l'obscurité pendant 30 mn, lire la densité optique à 515 nm. Le méthanol est utilisé comme un blanc.

Trolox est utilisé en tant que standard pour le calcul de la capacité anti-oxydante de l'extrait polysaccharidique de la gomme *Commiphora myrrha*.

La courbe d'étalonnage de Trolox est préparée selon un protocole modifié de MUSA *et al.* (2013) par différentes concentrations de Trolox de 50 à 500 µM.

II.4.4.2.2.4.-Calcul de pourcentage d'inhibition

L'activité anti-oxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH et déterminée selon l'équation suivante (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

$$\text{Pourcentage d'inhibition de DPPH} = [(A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle}] \times 100$$

II.4.3.3-Activité phagocytaire

II.4.3.3.1.- Principe du test

Le test de phagocytose est basé sur l'activation des cellules phagocytaires par les polysaccharides. Cette expérience est utilisée pour déterminer l'augmentation de la capacité de leucocytes à phagocyter les particules après stimulation par des extraits polysaccharidiques de la gomme *Commiphora myrrha* (HARUN *et al.*, 2015).

II.4.3.3.2.- Prélèvement du sang

Le sang humain est obtenue par une ponction veineuse aseptique réalisée sur des volontaires sains, de sexe masculin, âgé de 25 à 38 ans (KOKO *et al.*, 2008) le même jour de son utilisation au niveau de laboratoire IBN ROCHD Ghardaïa.

Le sang total est recueilli dans un tube contenant le sodium héparine comme anticoagulant (MAQBOOL *et al.*, 2011).

II.4.3.3.3.- Préparation des solutions et des réactifs

II.4.3.3.3.1.- Préparation des solutions tampons

II.4.3.3.3.1.1-Tampon phosphate saline (PBS)

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

➤ Composition de PBS

Le tampon est préparé à 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 11.- Composition de PBS selon BURNAT *et al.* (2013)

Composants	Quantité (g.l ⁻¹)
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,9
KH ₂ PO ₄	0,2

➤ 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 15 mn à une pression de 1 bar, à une température de 121°C et conservé à 25°C (ATLAS, 2010).

II.4.3.3.1.2.-Préparation de la solution de HANKS

La solution de HANKS connu sous le nom de HBSS (Hank'sbufferedsalt solution) qu'est une solution très délicate à fabriquer. Les étapes décrites pour la préparation de Hanks sont exécutées minutieusement (NAOUN, 2014).

➤ Composition de la solution de HANKS

La solution de HANKS est préparée à pH 7,4 (XIE *et al.*, 2012) dans 1000 ml d'eau distillée (XIE *et al.*, 2014b).

Tableau 12.- Composition de solution HANKS selon HANKS (1975)

Composants	Quantité (g.l ⁻¹)
CaCl ₂	1,4
NaCl	80
KCl	4,0
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0
KH ₂ PO ₄	0,6
Glucose	10,0
Rouge dephénol0,2%	0,4
NaHCO ₃	3,5

➤ **Préparation de la solution de HANKS (HANKS, 1975)**

Trois solutions sont préparées

❖ **Solution A**

- Dissoudre 1,4 g de CaCl₂ dans 200 ml d'eau distillée glacée.
- Dans un deuxième bécher de 1000 ml contenant 800 ml d'eau distillée glacée, les ingrédients restant sont ajoutés à l'exception de NaHCO₃, puis une agitation est effectuée jusqu'à dissolution.

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

❖ **Solution B**

Le rouge phénol 0,2% est préparé par dissolution de 0,4g de rouge phénol dans 200 ml d'eau distillée glacée. Ensuite, la solution est autoclavée.

❖ **Solution C**

Une solution isotonique de 1,4% de NaHCO₃ est préparée par dissolution de 3,5g de NaHCO₃ dans 250ml d'eau distillée glacée puis autoclavée. Cette solution est utilisée pour l'ajustement de pH.

II.4.3.3.2.- Préparation de la solution de *Candida albicans*

Candida albicans est inoculé dans un milieu liquide de Sabouraud à partir d'une culture mère maintenue sur la gélose inclinée de Sabouraud. Puis, 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 400 g pendant 10 min (GHONEUM et GOLLAPUDI, 2004).

Le culot est lavé deux fois avec 1 ml de tampon PBS stérile (TAVANTI *et al.*, 2006) et centrifugé à 460 g à 4 °C pendant 10 min, puis incubé pendant 1 h à 90°C pour tuer les *C. albicans* (GHONEUM et GOLLAPUDI, 2004). Les levures mortes sont lavées deux fois dans 1 ml de PBS et centrifugé (RAGSDALE et GRASSO, 1989).

La concentration de cellules dans le PBS est estimée par mesure de l'absorbance à 540 nm. L'absorbance est ajustée à 1,0 qui correspond à 1 x 10⁷ blastoconidies de *C. albicans* /ml, approximativement (GHONEUM et GOLLAPUDI, 2004 ; TAVANTI *et al.*, 2006).

II.4.3.3.3- Préparation de la solution mère de polysaccharide

Les polysaccharidiques hydrosolubles issus de la gomme *Commiphora myrrha* sont testés pour leur capacité d'activer la phagocytose de *C. albicans* par les leucocytes humains (POPOV *et al.*, 1999).

Une concentration de 1mg.ml^{-1} de l'extrait polysaccharidique est préparé dans la solution de HANKS (NERGARD *et al.*, 2005).

II.4. 3.3.3.4- Préparation de la solution 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).

FREIRE-GARABAL *et al.* (1993) ont utilisé le test au zymosan pour mesurer la phagocytose *in vitro*.

Une concentration de 1mg.ml^{-1} est préparée de zymosan considéré comme contrôle positive (EDVARD *et al.*, 1978).

II.4. 3.3.3.4.- Exploration de la phagocytose et récupération des cellules phagocytaires (protocole modifié)

L'extrait polysaccharidique $40\mu\text{l}$ est mélangé avec $200\mu\text{l}$ du sang hépariné et incubé dans un incubateur avec agitation 60 rpm à 37°C pendant 30 min. Puis, les tubes sont mis sur la glace pour arrêter la réaction (HARUN *et al.*, 2015). Les cellules stimulées sont lavées deux fois par 1 ml de PBS (CHEN *et al.*, 2015) froide 4°C , puis centrifugé à 250g pendant 5 min à 4°C (ROSSI *et al.*, 2013).

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

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

Tableau 13.-Test de phagocytose

Concentration		1 mg.ml ⁻¹
Contrôle positif	Sang total (µl)	200
	Zymosan (µl)	40
	<i>Candida albicans</i> (µl)	40
<i>Commiphora myrrha</i>	Sang total (µl)	200
	Polysaccharides (µl)	40
	<i>Candida albicans</i> (µl)	40
Contrôle négatif	Sang total (µl)	200
	Solution de Hanks (µl)	40
	<i>Candida albicans</i> (µl)	40

II.4.3.3.3.5.- Lyse des érythrocytes

MAQBOOL *et al.* (2011) ont lysé les érythrocytes par 2 ml d'une solution de lyse pour obtenir une population pure de granulocytes.

La lyse des hématies est effectuée une fois pendant 20s (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 2 ml d'un tampon HBSS suivi d'une centrifugation à 400g pendant 10 min et les échantillons sont ensuite lavés par 3 ml de PBS, deux fois (HARUN *et al.*, 2015).

II.4.3.3.3.6.- Préparation de frottis sur lame

La préparation des frottis se fait selon la méthode de ROUËSSE (2002)

- Prélever 5µl de chaque culot cellulaire à l'aide du compte-goutte;
- Déposer la goutte à l'extrémité d'une lame en verre propre ;
- Étaler à l'aide d'une autre lame, immédiatement et régulièrement ;
- Sécher le frottis à l'air libre (MOINFAR *et al.*, 2012).

II.4.3.3.3.7.- Fixation par le méthanol

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

II.4.3.3.3.8.- 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).

➤ **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).

➤ **Préparation de la coloration MGG (MERCK, 2008)**

1. Préparation de la solution d'éosine-bleu de méthylène à partir de colorant selon May-Grünwald

Dans 100 ml de méthanol, 0,25g d'éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald est dissous 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 30 ml de solution éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald avec 150 ml d'eau distillée et 20 ml de solution tampon.

2. Solution de Giemsa diluée pour la coloration manuelle

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

➤ **II.4.4.3.11.3.- Procédure de la coloration May-Grünwald-Giemsa (NORUM *et al.*, 2005 ; WILDEMANN *et al.*, 2011)**

- Sécher la préparation cellulaire à l'air ;

- Couvrir le frottis pendant 3 mn par une solution de May-Grünwald-Giemsa (éosine avec bleu de méthylène) ;
- Eliminer l'excès de colorant en rinçant avec l'eau du robinet ;
- Couvrir le frottis de 15 à 20 mn avec une solution fraîche de Giemsa filtré (la solution standard dilué à 1:10 avec l'eau du robinet) ;
- Laver rapidement avec l'eau du robinet ;
- Sécher le frottis à l'air.

II.4.3.3.9.- 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.4.3.3.10.- 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 est représentée comme suit:

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

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

II.4.3.3.10- 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:

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

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

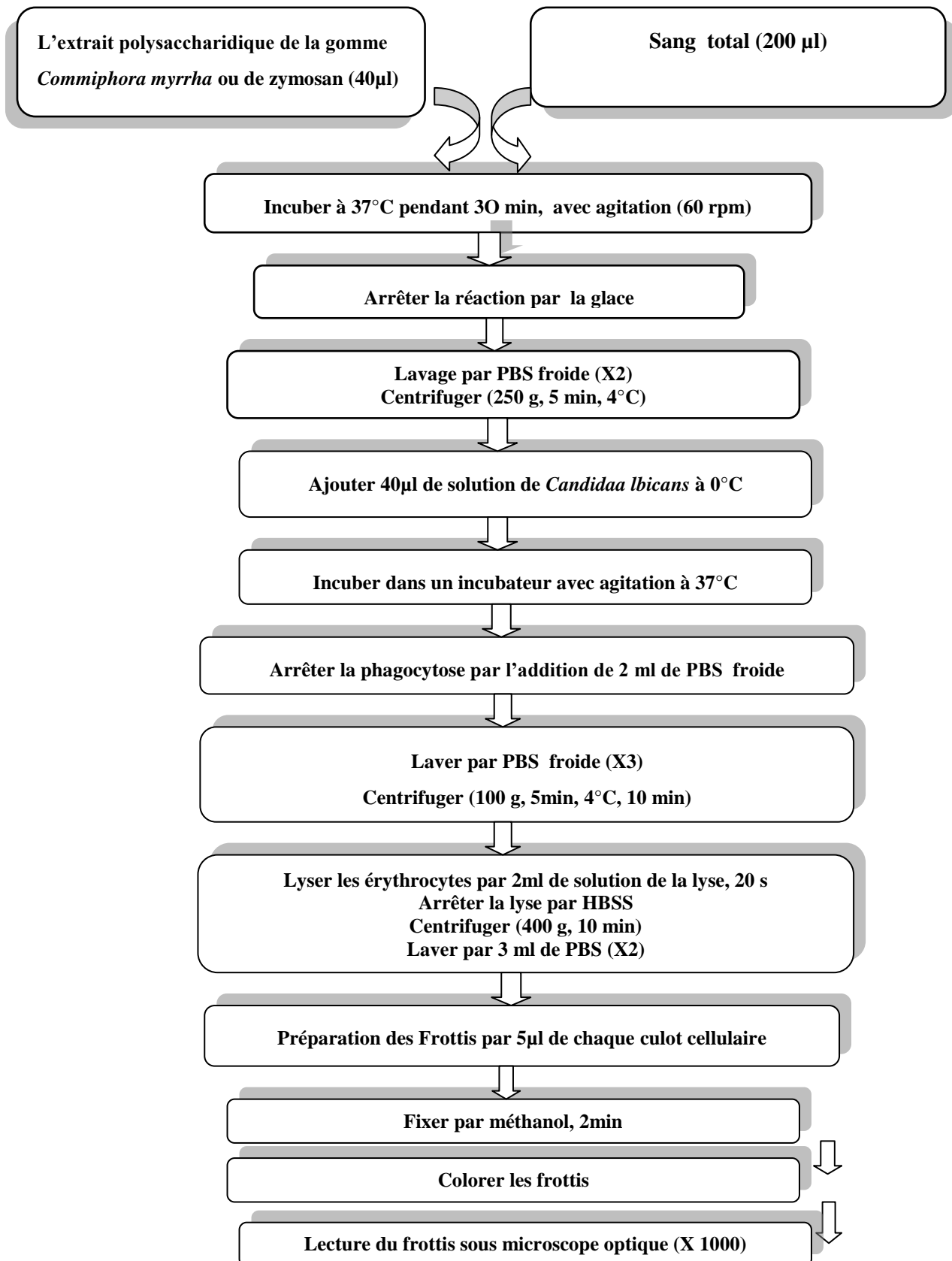


Figure 06.- Différentes étapes de tests de phagocytose selon CZUPRYNSKI *et al.* (1991); EHLERS *et al.* (1992); GIAIMIS *et al.* (1992); ROUËSSE (2002); NORUM *et al.* (2005); SEBAHOUN (2005); MAQBOOL *et al.* (2011); PONTE *et al.* (2012); ROSSI *et al.* (2013); CHENA *et al.* (2014); HARUN *et al.* (2015); CHEN *et al.* (2015)

Chapitre III.-

Résultats et discussions

III.1.- Rendement polysaccharidique

Le rendement relatif est calculé par rapport au poids de matière sèche ayant servi à l'extraction (MOURADI *et al.*, 2006).

Il apparaît que le rendement massique de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles de la gomme *Commiphora myrrha* par rapport à la matière sèche est de 36,84%. Ce rendement est inférieur à celui de rendement signalé par HOUGH *et al.* (1952) soit 40%; et supérieur de celui de la gomme *Acacia tortilis* 25,8% (BICHT *et al.*, 2013).

ASHRY *et al.* (2010) ont rapporté un rendement de la gomme *Commiphora myrrhae* entre 30 à 60%. Le rendement massique de polysaccharides hydrosolubles de la gomme obtenu est inférieur de celui des graines de *Sterculiae Lychnophorae* 40,7% signalé par AI *et al.* (2012).

Il est aussi remarqué que l'extrait polysaccharidique de la gomme a un aspect grisâtre, avec des taches de couleur blanc.

Le rendement des polysaccharides extraits de la gomme peut varier en fonction de sa source, l'âge des arbres à partir de laquelle elle a été obtenu, les conditions climatiques et l'environnement du sol (AL-ASSAF *et al.*, 2005; ANDERSON *et al.*, 1968; IDRIS *et al.*, 1998; ISLAM *et al.*, 1997; KARAMALLA *et al.*, 1998; VERBEKEN *et al.*, 2003).

De même, le type de polysaccharide et la procédure d'extraction comme la décoction, la macération, le type et la quantité de solvant, les températures et les concentrations utilisées. agissent aussi sur le rendement massique de polysaccharides (EBRINGEROVA *et al.*, 2003; MOURADI *et al.*, 2006).

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

Le tableau 14 donne la composition de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble de la gomme *Commiphora myrrha*.

Les teneurs en oses totaux, neutres, acides de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble de la gomme sont de 48,57±2,63%, 42,50±0,66%, 6,43±1,54% respectivement.

Tableau 14.- Composition biochimique de l'extrait polysaccharidique de la gomme *Commiphora myrrha*.

Totaux	Osés		Protéines LOWRY	Protéines BRADFORD
	Acides	Neutres		
48,57±2,63%	6,43±1,54%	42,50±0,66%	13,49± 0,00%	29,96±7,37%

Les oses totaux, sont les composants majeurs de l'extrait polysaccharidique. Elle représente $48,57 \pm 2,63\%$ de l'extrait polysaccharidique de la gomme. L'extrait contient une faible teneur en acides uroniques $6,43 \pm 1,54\%$ par rapport à la teneur en oses neutres soit, $42,50 \pm 0,66\%$. HOUGH *et al.* (1952) ont signalé une teneur plus élevée de 64% en oses totaux.

Les polysaccharides hydrosolubles issus de la gomme *Prosopis alba* et de la gomme arabique renferment $13,033 \pm 0,33\%$, $1,37 \pm 0,04\%$ de protéines, respectivement (VASIL *et al.*, 2016). Ces teneur en protéines sont inférieurs à ceux de la gomme *Commiphora myrrha* $29,96 \pm 7,37\%$. Ainsi, VASIL *et al.* (2016) ont noté des tenures en oses totaux de $61,62 \pm 0,09\%$, $65,20 \pm 0,58\%$ des polysaccharides issus de la gomme *Prosopis alba* et de la gomme arabique, respectivement. Tandis que ces teneurs en oses totaux sont supérieure de celle la gomme.

L'étude de QIAN *et al.* (2011) sur les polysaccharides hydrosolubles de la gomme sécrétés des troncs des arbres de pêche en cas d'une infection fongique donne une teneur $85,67 \pm 0,37\%$ d'oses totaux et $14,45 \pm 0,68\%$. Ces pourcentages sont supérieur à ceux de la gomme de cette étude.

La composition biochimique des polysaccharides extraits de la gomme peut varier en fonction de sa source, l'âge des arbres à partir de laquelle elle a été obtenu, les conditions climatiques et l'environnement du sol (AL-ASSAF *et al.*, 2005; ANDERSON *et al.*, 1968; IDRIS *et al.*, 1998; ISLAM *et al.*, 1997; KARAMALLA *et al.*, 1998; VERBEKEN *et al.*, 2003).

III.3.- Caractérisation par chromatographie sur couche mince des polysaccharides

La détermination des R_f d'oses étalons permet d'identifier partiellement les principaux oses constitutifs de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles de la gomme *Commiphora myrrha*. Ceci par comparaison des rapports frontaux des taches apparues avec ceux des étalons.

La lecture de chromatogramme de système I, révèle la présence de trois spots d'ose de R_f : 0,153, 0,355 et 0,478. Tandis que le système II donne cinq spots d'ose de R_f : 0,052, 0,104, 0,395, et 0,476. Le système III montre trois spots d'ose de R_f : 0,414 et 0,565. Ainsi, le système IV révèle trois spots d'ose de R_f : 0,108, 0,485 et 0,594.

Tableau 15.-Rapports frontaux (R_f) des oses étalons dans les quatre systèmes de CCM

Type d'ose	Système I	Système II	Système III	Système IV
Acide D-glucuronique	0,153	0,104	0,454	0,108
Acide D-galacturonique	0,122	0,081	0,424	0,050
L-arabinose	0,478	0,476	0,565	0,485
D-galactose	0,355	0,395	0,515	0,536
D-glucose	0,404	0,453	0,555	0,594
D-mannose	0,472	0,482	0,565	0,673
L-rhamnose	0,717	0,656	0,676	0,739
D-xylose	0,62	0,610	0,626	0,64
D-fructose				0,52
Tréhalose				0,24
N-acetyl glucosamine				0,41
Maltose				0,25
Extrait polysaccharidique				
	0,153	0,052	0,414	0,108
	0,355	0,104	0,565	0,485
	0,478	0,395	-	0,594
	-	0,476	-	-
	-		-	-

Par comparaison des rapports frontaux des taches apparues dans l'extrait polysaccharidique avec ceux des étalons, il est appa  t que les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* sont constitués principalement d'arabinose, de galactose, d'acide glucuronique. Ceci a montré principalement pour les deux systèmes (I, II).

Ainsi, des taches inconnues sont apparues dans le système (II) de R_f : 0,052 et dans le système (III) de R_f : 0,414. Il est souhaitable donc de suivre l'identification par d'autres techniques d'analyse    savoir la CG/MS et ou l'HPAEC afin de déterminer la nature et la rati  on des oses.

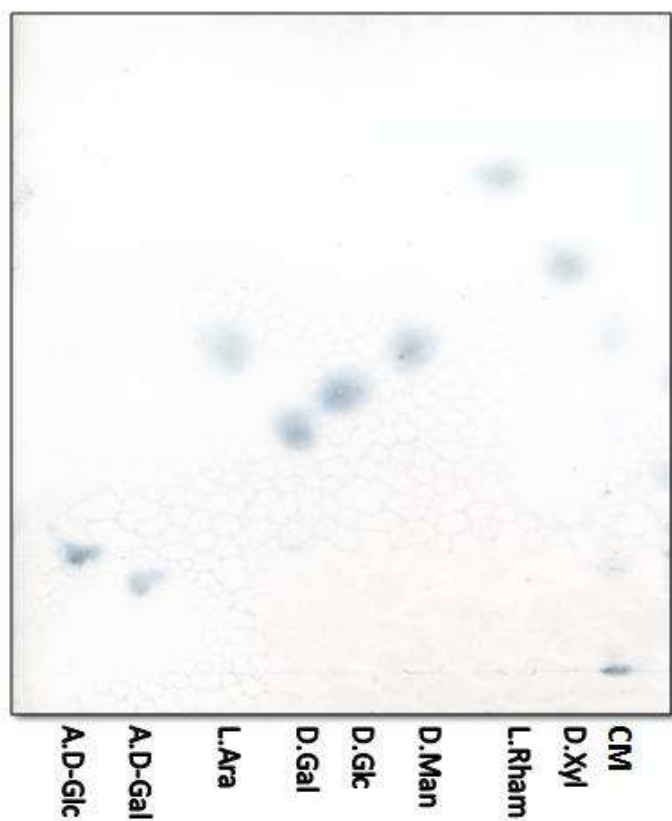


Figure 07a.- Chromatogramme du système (I)

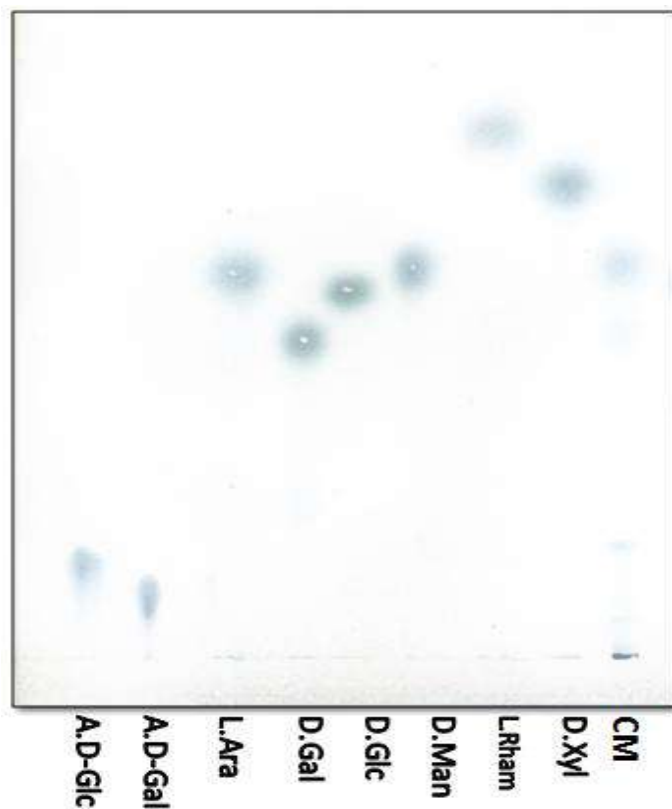


Figure 07b.- Chromatogramme du système (II)

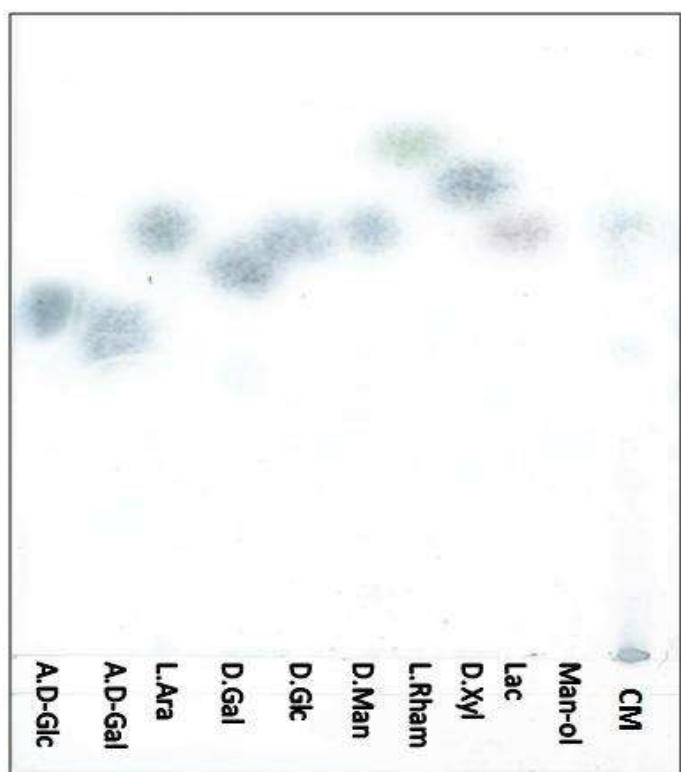


Figure 07c.- Chromatogramme du système (III)

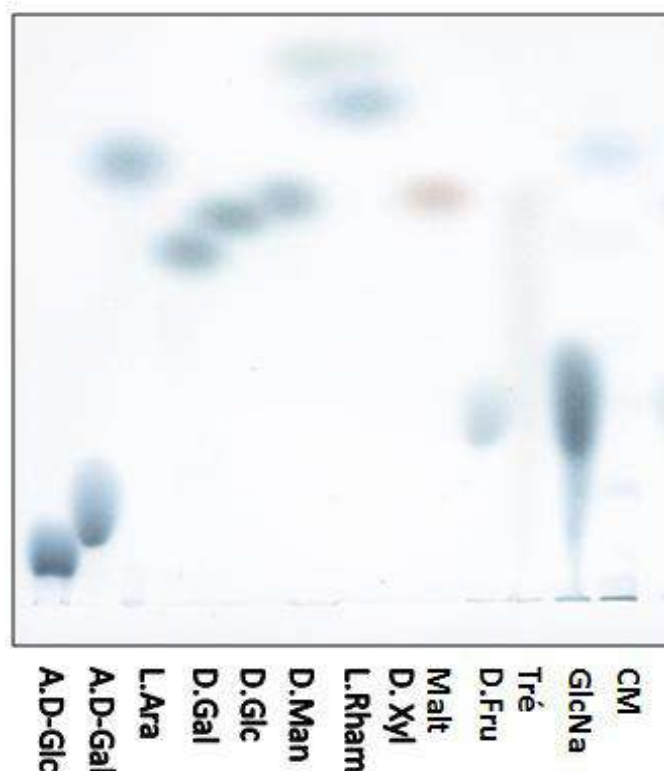


Figure 07d.- Chromatogramme du système (IV)

Figure 07.- Chromatogrammes des polysaccharides de la gomme dans les systèmes (I, II, III, IV) par CCM

Les chromatogrammes montrent un mélange des oses neutres et acides, pentoses et hexoses. On remarque l'existence des taches larges et denses de coloration verdâtre qui correspondent à l'arabinose, aussi des taches moins denses et petites de l'acide glucuronique et des taches plus claires et moyennement larges de galactose dont la couleur est noire. Cela laisse suggérer la présence d'un galactoarabinane.

Donc, l'extrait brut des polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* renferme un hétéro-polysaccharide, constitué majoritairement d'arabinose, de galactose et d'acide glucuronique.

Ces résultats semblent proches à ceux de HOUGH *et al.* (1952) qui ont signalé que la gomme de *Commiphora myrrha* est constituée de galactose, d'arabinose et de 4-méthyl acide glucuronique. Tandis qu'ils ont signalé que la gomme est constituée en majorité de galactose (20%), d'arabinose (5%) et de 4-méthyl acide glucuronique dont le rapport est de 4:1:3.

ALI *et al.* (2009) ont rapporté que la gomme arabique est constituée de 39 à 42% de galactose, 24 à 27% d'arabinose, 12 à 16% rhamnose, et 15 à 16% d'acide glucuronique.

Le Tragacanthine, fraction hydrosoluble des polysaccharides hydrosolubles issus de la gomme adragante qui représente 30 à 40% des polysaccharides contient le L-arabinose, le L-fucose, le D-mannose, le D-glucose, le D-galactose et le D-xylose. Tandis que la fraction insoluble dans l'eau nommée bassorin représente 60 à 70% et est constituée principalement de: L-fucose, D-xylose, D-acide glucuronique, D-galactose et L-rhamnose. (GHAYEMPOUR *et al.*, 2015).

De plus, AL-ASSAF *et al.* (2009) ont noté que les polysaccharides de la gomme ghatti sont constitués principalement de L-arabinose, D-galactose, D-mannose, D-xylose, et D-acide glucuronique avec les rapports: 48:29:10:5:10.

Toujours ces différences en compositions en oses constitutifs des polysaccharides issus de la gomme et leurs pourcentages et ratios sont expliqués par leurs sources, l'âge des arbres à partir de laquelle elle a été obtenue, les conditions climatiques et l'environnement du sol (AL-ASSAF *et al.*, 2005; ANDERSON *et al.*, 1968; IDRIS *et al.*, 1998; ISLAM *et al.*, 1997; KARAMALLA *et al.*, 1998; VERBEKEN *et al.*, 2003). Ainsi, il est souhaitable de suivre l'identification par d'autres techniques d'analyse à savoir la CG/MS et ou l'HPAEC afin de déterminer la nature et le ratio des oses. Et donc de confirmer en plus ces résultats.

III.4.- Activités biologiques des polysaccharides

III.4.1.- Activité anti diabétique

La **figure 08** présente les pourcentages d'inhibition (%) de l'activité enzymatique de l' α -D-glucosidase en présence de l'acarbose ou de l'extrait polysaccharidique.

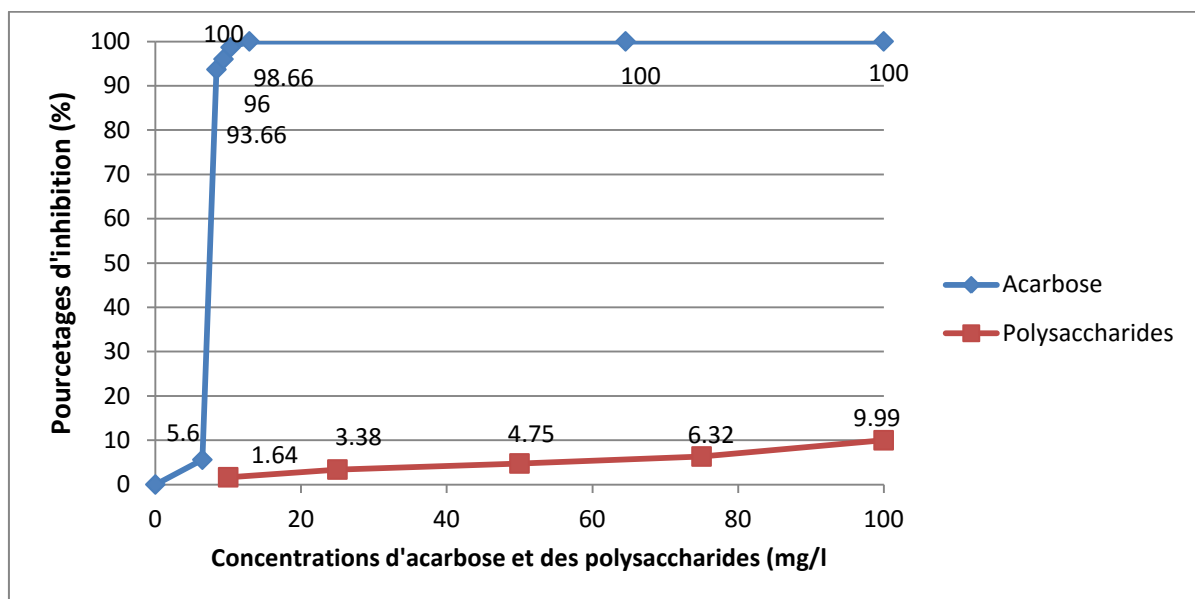


Figure 08.- Pourcentages d'inhibition (%) de l' α -D-glucosidase en présence de l'acarbose ou de l'extrait polysaccharidique.

Il apparaît que l'extrait des polysaccharides a un faible pouvoir inhibiteur de l' α -D-glucosidase. Le pourcentage d'inhibition des polysaccharides est de 9,9% pour une concentration maximale de 100 mg/l et de 1,64% pour une concentration minimale de 10 mg/l. Tandis que l'acarbose a un fort pouvoir inhibiteur. Cette inhibition est de 100% à partir de la concentration 12,91mg/l, tandis qu'il semble que cette inhibition est négligeable à la concentration de 6,456 mg/l. Il est remarqué que pour l'acarbose et l'extrait des polysaccharides les pourcentages d'inhibitions augmentent proportionnellement avec l'augmentation des concentrations.

ALI-SHTAYEH *et al.* (2012) ont rapporté que *Commiphora myrrha* est parmi les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle de Palestine pour traiter le diabète. Les différentes parties de la plante sont pris comme complément alimentaire chez les patients diabétiques et montrent des effets bénéfiques, y compris un ralentissement de la progression de la maladie, le soulagement des symptômes, la résolution de la maladie ou une réduction

des effets secondaires des médicaments allopathiques. Tandis qu'on a signalé que les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* ont une faible capacité inhibitrice sur l'enzyme α -D-glucosidase.

L'arabinogalactane issu d'*Acacia tortilis* a montré un pourcentage d'inhibition de l'enzyme α -D-glucosidase élevé. Cette inhibition est maximale à la concentration de 5 mg/ml est de 76,77%. Tandis que l'acarbose a donné une inhibition maximale à une concentration 16,14 g/l, soit 74,88% (BISHT *et al.*, 2013). Cette inhibition semble inférieure à celle des polysaccharides d'*Acacia tortilis* aussi à celle d'acarbose qu'on a noté. Selon BISHT *et al.* (2013) les pourcentages d'inhibitions augmentent avec l'augmentation des concentrations à partir de 0,1 g/l à 5mg/l et de 0,645 g/l à 16,14 g/l pour les polysaccharides et l'acarbose, respectivement.

Selon les résultats obtenus, il est constaté que la gomme *Commiphora myrrha* n'a pas un effet important sur l'activité enzymatique de l'enzyme α -D-glucosidase. L'étude de l'activité enzymatique est finement influencée par les conditions et les paramètres expérimentaux tels que la durée d'incubation, la température, le pH ...etc. De même le type de polysaccharides à étudier et leur pureté.

L'étude d'effet des polysaccharides sur l'activité enzymatique de l' α -D-glucosidase est l'une des méthodes et paramètres pour élucider et identifier l'activité anti diabétique. Il est souhaitable donc de continuer les études sur l'activité anti diabétique mais avec les autres voies métaboliques et hormonales pour confirmer ou infirmer l'activité anti diabétique de la gomme *Commiphora myrrha* .

III.4.2.- Activité anti oxydante

Les figures 15 illustrent les activités anti oxydantes de l'extrait polysaccharidique issu de la gomme de *Commiphora myrrha*. La figure 09.a représente les pourcentages d'inhibitions de radical libre ABTS^{•+} par les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* (CM), la figure 09.b montre les pourcentages d'inhibitions de radical libre DPPH[•] par les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* (CM).

D'après les résultats on constate que les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* ont un faible pouvoir inhibitrice des radicaux libres ABTS^{•+}, DPPH[•] dans la gamme de concentration testée.

À la concentration 1mg/ml, Les pourcentages d'inhibition de radical libre ABTS^{•+} et DPPH[•] sont maximale de 4,71% et 32%, respectivement. Tandis que le Trolox a donné un pourcentage maximale d'inhibition des radicaux libres ABTS^{•+} et DPPH[•] de 80% à une concentration de 125 mg/l, 150 mg/l, respectivement.

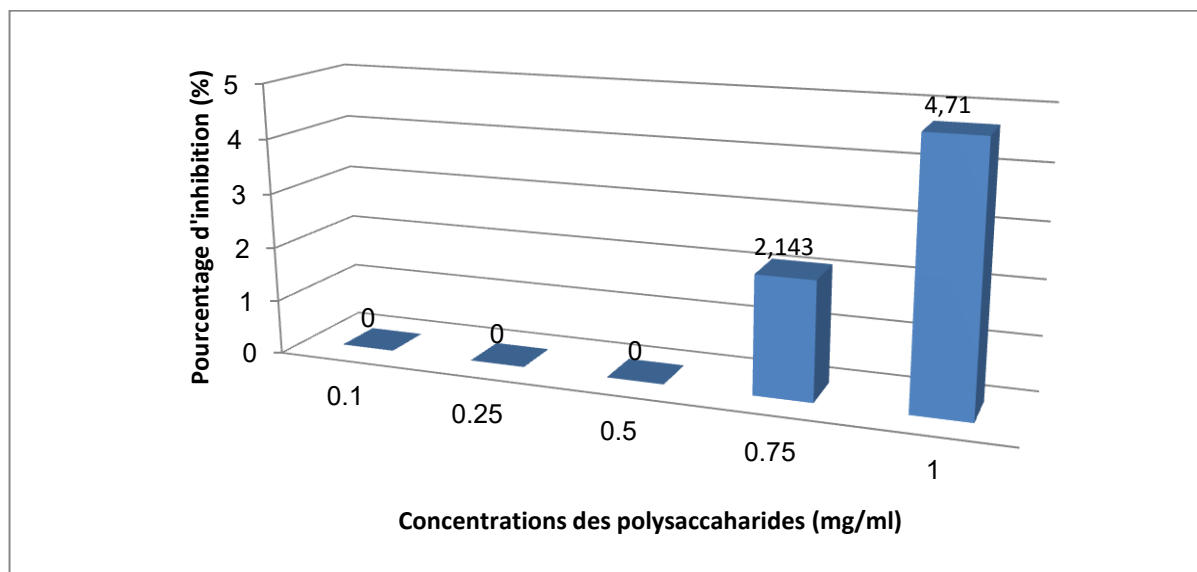


Figure 09.a- Pourcentages d'inhibitions de radical libre ABTS^{•+}

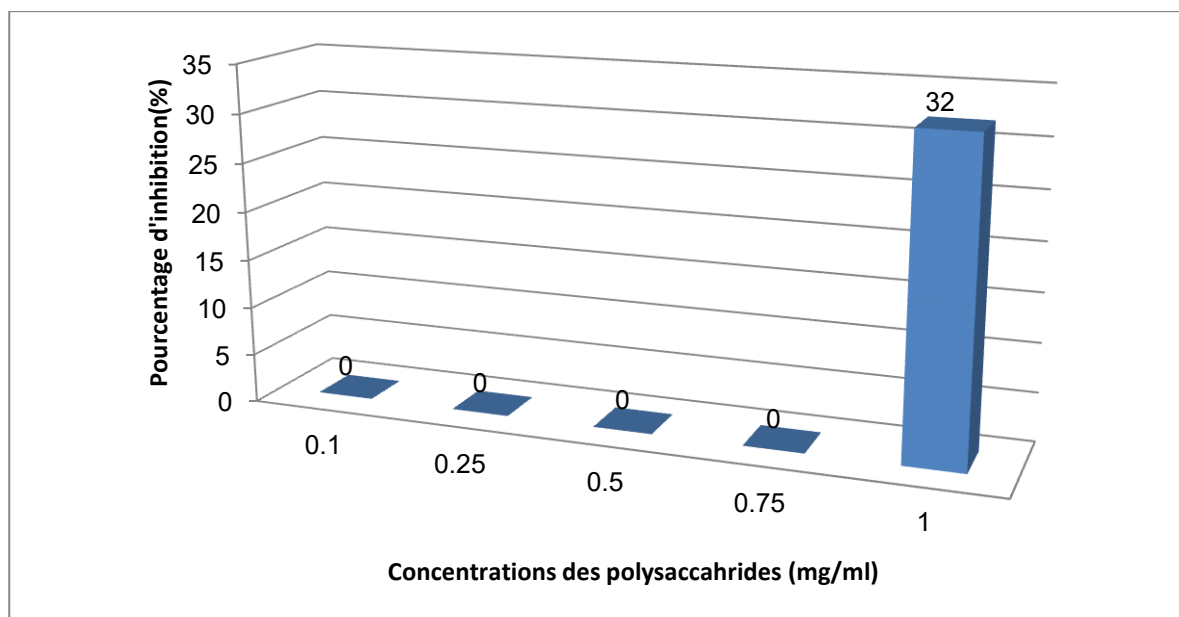


Figure 09.b- Pourcentages d'inhibitions de radical libre DPPH[•]

Figure 09.- Activités anti oxydantes de l'extrait de polysaccharides issus de la gomme de *Commiphora myrrha*

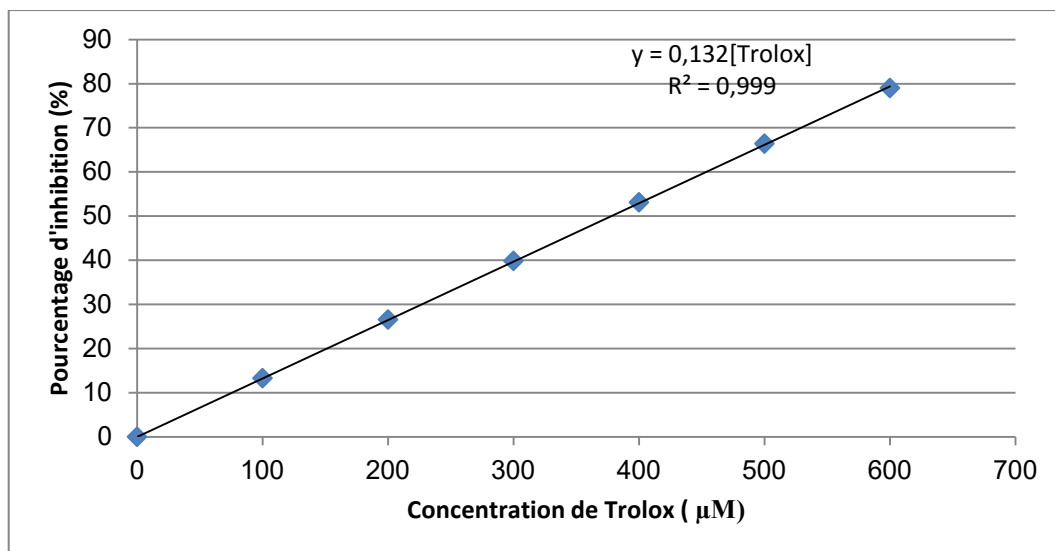


Figure 10.- Courbe d'étalonnage de Trolox de test ABTS

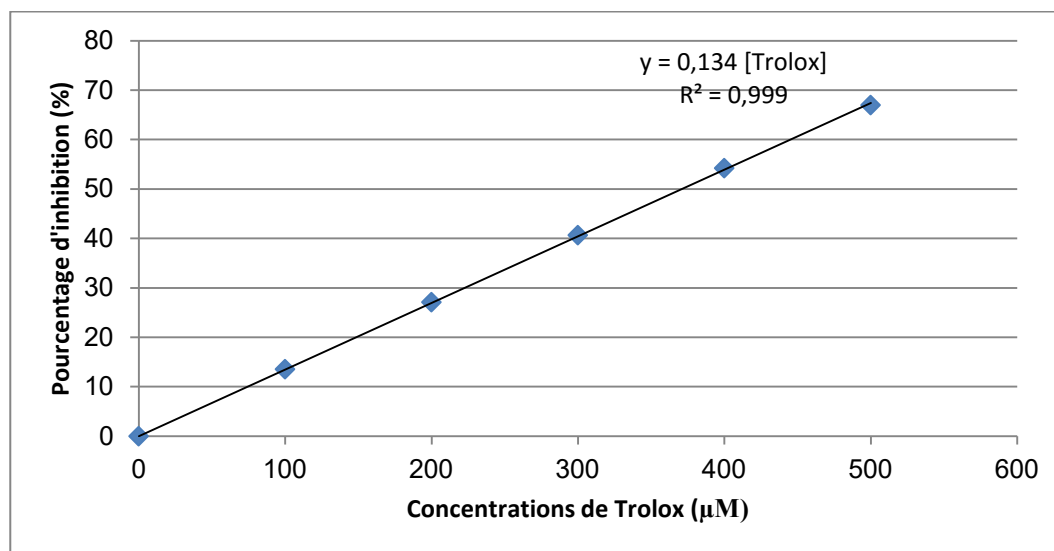


Figure 11.- Courbe d'étalonnage de Trolox de test DPPH

Trois hétéro-polysaccharides acides (PTPS-1, PTPS-3, PTPS-5) issus de *Camellia sinensis* L. contiennent de L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose, D-fucose et des acides uroniques à des teneurs élevés de $32,63 \pm 4,79\%$, $40,66 \pm 1,56\%$, $40,44 \pm 0,78\%$, respectivement; ainsi des taux importants en protéines de $4,23 \pm 1,89\%$, $13,27 \pm 0,54\%$, $19,96 \pm 1,03\%$. XU *et al.* (2014) ont montré que les trois hétéro-polysaccharides acides ont montré une forte activité anti oxydante.

PTPS-1, PTPS-3, PTPS-5 ont des pourcentages d'inhibition de radical libre ABTS⁺ de 20%, 60%, 80% à une concentration maximale 1mg/ml par rapport le standard Hydroxytoluène butylé (BHT) qui a un pourcentage de 100 % à 1 mg /ml.

Les pourcentages d'inhibition de DPPH de trois polysaccharides sont de 40%, 80%, 90%, respectivement à une concentration maximale de 1 mg/ml. Le standard BHT a donné une inhibition de 80% à même concentration.

Pour les trois testes de l'activité anti oxydante des polysaccharides PTPS-1, PTPS-3, PTPS-5 est supérieure à celle qu'on a noté pour les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha*. Ainsi que il est signalé que les pourcentages d'inhibitions des radicaux libres ABTS⁺, DPPH sont relativement proportionnels avec les teneurs en acides uroniques pour les trois polysaccharides $32,63 \pm 4,79\%$, $40,66 \pm 1,56\%$, $40,44 \pm 0,78\%$, respectivement. Ceci indique que plus les polysaccharides contiennent des taux élevés en acides uroniques plus que l'activité anti oxydante est élevée.

Les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* ont montré un taux de $6,43 \pm 1,54\%$, ce qui explique leur faible activité anti oxydante pour les tests ABTS et DPPH.

En outre, l'étude de MENG *et al.* (2015) sur les polysaccharides de *Hirsutella* sp qui comportent une teneur élevée en protéines montre une meilleure activité de piégeage des radicaux hydroxyles. Les fonctions anti oxydantes de la protéine peuvent être attribuées à leurs contenus en acides aminés, qui sont capables de donner des protons aux radicaux libres.

Certes, les activités anti oxydantes des polysaccharides sont affectées par leurs compositions en monosaccharides, leurs structures chimiques, leurs poids moléculaire (WANG *et al.*, 2014) et même les méthodes de leur extraction (CHEN *et al.*, 2008).

III.4.3.- Activité phagocytaire

Le présent travail s'intéresse à l'étude de l'activité phagocytaire des cellules immunitaires issues de sang total sur les levures de *Candida albicans*. L'extrait de polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* est testé, en considérant le zymosan comme contrôle positif.

Les résultats obtenus sont exprimées en pourcentages de la capacité phagocytaire, en calculant aussi l'activité phagocytaire de l'extrait polysaccharidique de la gomme *Commiphora myrrha* (CM). La présentation graphique des résultats est figurée en histogramme pour la capacité phagocytaire (Fig. 12) et pour l'activité phagocytaire (Fig.13).

D'après les résultats obtenus (figures 12 et 13), il est noté que la capacité phagocytaire des leucocytes en présence de zymosan comme contrôle positif est de $47,67 \pm 1,53\%$. Le contrôle négatif a donné une capacité phagocytaire de $29,33 \pm 1,15\%$, semble être supérieure à ceux des contrôles négatifs estimés par GIAIMIS *et al.* (1992) soit $22,5 \pm 0,2\%$ pour *Saccharomyces cerevisiae*, de $18,2 \pm 1,1\%$ pour les bactéries *Aeromonas hydrophila* selon EL-BOSHY *et al.* (2010) et de 21% d'une souche ICB-156 de *Candida albicans* selon WEINFELD *et al.* (1999). EL-BOSHY *et al.* (2010) ont ainsi signalé une capacité phagocytaire de $26,8 \pm 0,92\%$ pour le zymosan comme contrôle positif. Cette capacité est inférieure à celle de contrôle positif qu'on a noté.

Les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* possèdent une capacité phagocytaire des leucocytes de $35,33 \pm 1,15\%$, tandis que l'activité phagocytaire est de 12,33%. Cette activité est inférieure à celle de zymosan, soit 18,33%. SENDL *et al.* (1993), ont étudié la capacité phagocytaire des rhamnogalacturonanes extraits à partir des feuilles du *Telephium Sedum*. Ces polysaccharides induisent une forte stimulation de la phagocytose par les granulocytes. La capacité phagocytaire de cette fraction polysaccharidique à une dose de 1mg/ml montre une stimulation de 200%, *in vitro*.

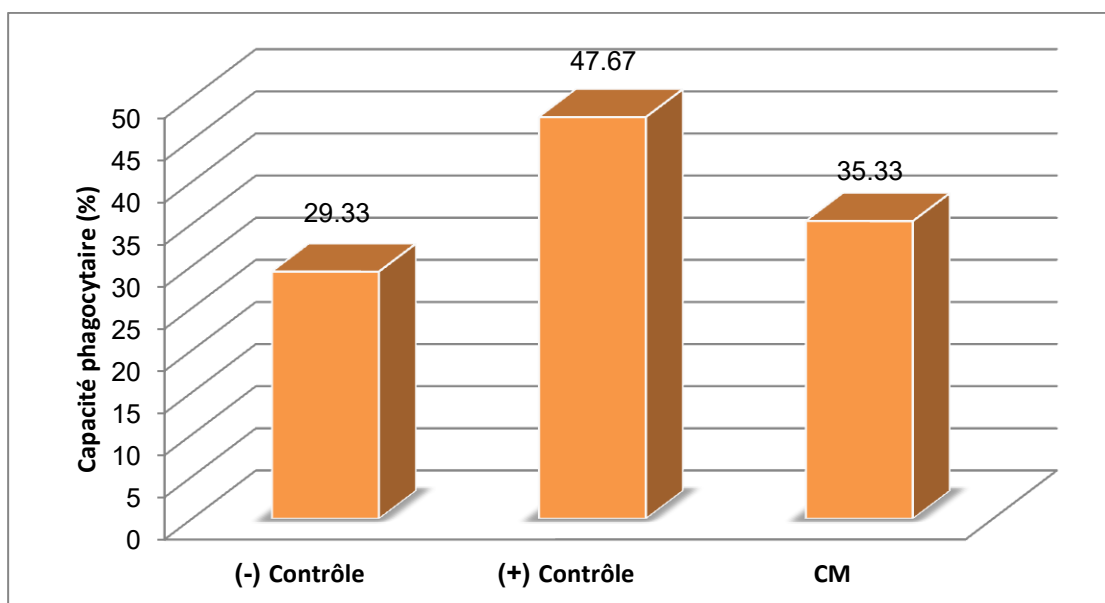


Figure 12.- Capacité phagocytaire de l'extrait polysaccharidiques de la gomme *Commiphora myrrha* (CM)

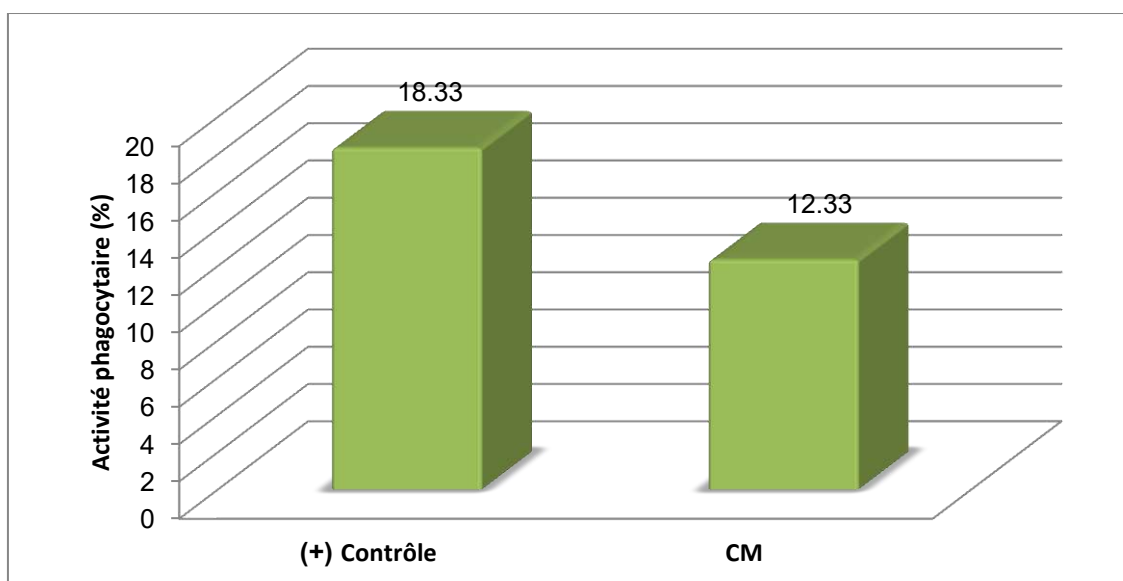


Figure.13.- Activité phagocytaire de l'extrait polysaccharidiques de la gomme *Commiphora myrrha* (CM)

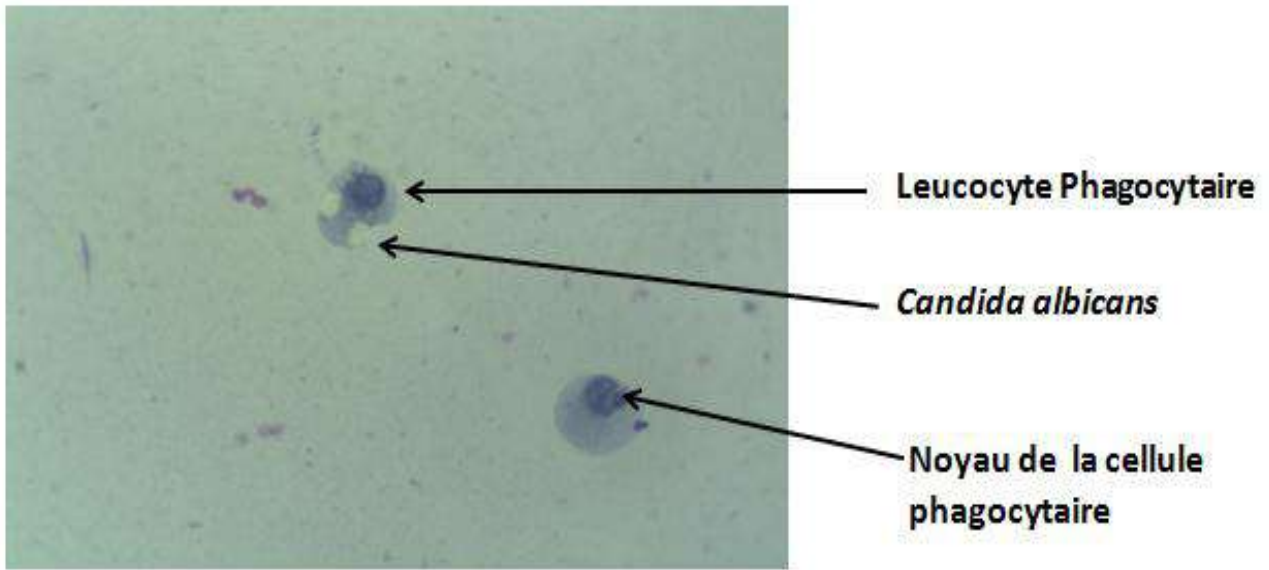


Photo 03.- Observation microscopique de la phagocytose des *Candida albicans* en présence des zymosan (x 1000) (Photo Originale)



Photo 04.- Observation microscopique de la phagocytose des *Candida albicans* en présence des polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha*(x 1000) (Photo Originale)

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs.

Des nouvelles sources de polysaccharides, extraits de la gomme *Commiphora myrrha* Nees. (Burseraceae), gomme-résine aromatique s'écoule naturellement ou par incision du tronc de la plante *Commiphora myrrha* récoltée de sud algérienne qui présentent des propriétés biologiques innovantes.

La première étape de cette étude est consacrée à l'étude de la composition chimique des polysaccharides hydrosolubles issus de la gomme. Elle a mis en évidence deux groupes d'oses: acides et neutres, et des protéines dont les taux sont très variables.

La deuxième partie concerne l'étude de la composition des polysaccharides en oses constitutifs. L'extrait polysaccharidiques est analysé par chromatographie sur couche mince suivant quatre systèmes de séparation qui permet une étude rapide, simple et moins laborieuse des hydrolysats des polysaccharides étudiés dans le but de les caractériser.

L'analyse a montré la présence d'arabinose, de galactose et d'acide glucuronique. Ceci indique la présence d'un galactoarabianane.

La troisième partie porte sur l'étude des activités biologiques, à savoir l'activité anti diabétique, anti-oxydante, et l'activité phagocytaire de l'extrait polysaccharidique.

Le test de l'activité anti diabétique basé sur la mesure de pouvoir inhibitrice de l'enzyme α -D-glucosidase. Les polysaccharides de la gomme montrent un faible pouvoir inhibiteur de l'enzyme α -D-glucosidase aux concentrations testées.

L'extrait polysaccharidique indique une activité anti-oxydante faible aux concentrations faibles testées.

Les activités phagocytaires mentionnées indiquent dans leur intégralité que les polysaccharides issus de *Commiphora myrrha* peuvent activer la phagocytose des leucocytes. Une efficacité maximale à induire la capacité phagocytaire des leucocytes isolés à partir du sang total à ingérer les cellules de la levure *Candida albicans*.

Ainsi il apparait clairement que les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha* ont un potentiel thérapeutique significatif, reste à définir les polysaccharides bioactifs et leurs mécanismes d'immuno-modulation dans des études prochaines.

Finalement, les résultats des activités biologiques (anti diabétique, anti-oxydante et immuno-modulatrices,) des polysaccharides illustrés dans cette étude peuvent justifier l'utilisation de la gomme *Commiphora myrrha* dans la médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire.

Au terme de ce travail nous espérons, avoir contribué à mettre en disponibilité des médicaments à base de plantes médicinales efficaces et accessibles pour les traitements.

Perspectives

Pour une meilleure évaluation des activités biologiques: anti diabétique, anti-oxydante, et l'activité phagocytaire des polysaccharides, on propose de purifier l'extrait polysaccharidique, afin de préciser les parties responsables des effets remarqués.

En plus une analyse structurale par, spectrométrie de masse SM et par la résonance magnétique RMN est recommandée pour établir une relation structure fonction entre l'extrait et les activités signalées.

Afin de confirmer les résultats obtenus par CCM, on suggère de faire appel à des techniques plus avancées comme CG/MS et la HPAEC-PAD pour caractériser précisément les résidus glycosidiques constituant les polysaccharides de la gomme *Commiphora myrrha*.

Références bibliographiques

- 1.- ABID S., KHAJURIA A., PARAVAIZ Q., SIDIQ T., BHATIA A., SINGH S., AHMAD S., RANDHAWA M.K., SATTI N.K., 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.
- 2.- AI L., WU J., CHE N., WU 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.
- 3.-AL-ASSAF S., PHILLIPS G.O., WILLIAMS P.A., 2005.- Studies on acacia exudate gums. Part 1: the molecular weight of *Acacia senegal* gum exudates. *Food Hydrocoll.*, Vol.19, 647-660.
- 4.-AL-ASSAF S., PHILLIPS G. O., AMAR V., 2009.- Gum ghatti. *Handbook of Hydrocolloids*, 477-494
- 5.-ALI-SHTAYEH M. S., JAMOUS R. M., JAMOUS R. M., 2012.- Complementary and alternative medicine use amongst Palestinian diabetic patients. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, Vol.18:16-21.
- 6.-AHMED A. A., FEDAIL J. S., MUSA H. H., KAMBOH A. A., SIFALDIN A. Z., MUSA T. H., 2015.- Gum Arabic extracts protect against hepatic oxidative stress in alloxan induced diabetes in rats. *Pathophysiology*, Vol.22:189-194.
- 7.-AHMED A. A., FEDAIL J. S., MUSA H. H., KAMBOH A. A., SIFALDIN A. Z., MUSA T. H., 2016.-Gum arabic suppressed diet-induced obesity by alteration the expression of mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in mouse liver. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. Vol.7:15-20.
- 8.- AMAROWICZ R., PEGG R., RAHIMI-MOGHADDAM P., BARL B., WEIL J., 2004.- Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. *Food Chem.* 84 (4): 551-562.
- 9.- ANDERSON D.M.W., DEA I.C.M., KARAMALLA K.A., SMITH J.F., 1968.- Studies on uronic acid materials. Part XXIV. An analytical study of different forms of the gum from *Acacia senegal* Willd, *Carbohydr. Res.* 6, 97–103.
- 10.- ASHRY K. M., EL-SAYED Y. S., KHAMISS R. M., EL-ASHMAWY I. M., 2010.- Oxidative stress and immunotoxic effects of lead and their amelioration with myrrh (*Commiphora molmol*) emulsion. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 48:236-241.
- 11.- ATLAS R. M., 2010.-Handbook of Microbiological Media, 4ème Edition. Ed. CRC Press, USA: 831p.
- 12.-AUDIGIE C., DUPONT G. et ZONZAIN F., 1995.- Principe des méthodes d'analyse biochimique, 2ème Edition. Ed. Biosciences et Technique, Paris. 44-56p.

- 13.-BACHELET B., 2013.- Impact De La Phytothérapie Sur Le Système Immunitaire. Ed. Faculté De Médecine De Créteil: 15-17p.
- 14.- BARAHONA T., ENCINAS M. V., IMARAI M., MANSILLA A., MATSUHIRO B., TORRES R., VALENZUELA B., 2014- Bioactive polysaccharides from marine algae. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 4, 125-138.
- 15.-BARDOULAT M., 2007.- Les bienfaits de la mer: des algues à la thalassothérapie, les multiples vertus des produits de la mer. 5ème. Ed. Alpen, France.p50.
- 16.- BATTLE J., HA T., Li C., BEFFA V. D., RICE P., KALBFLEISCH J., BROWDER W., WILLIAMS D., 1998.- Ligand Binding to the (1→3)-β-D-Glucan Receptor Stimulates NF-κB Activation, but Not apoptosis in U937 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 249:499-504.
- 17.- BENZIE I. F. F. et STRAIN J. J., 1996.- The reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, vol. 239 (1): 70-76.
- 18.- 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.
- 19.- BISHT S., KANT R., KUMAR V., 2013.- α-D-Glucosidase inhibitory activity of polysaccharide isolated from *Acacia tortilis* gum exudate. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 59: 214-220.
- 20.- BLUMENKRANTZ N., et ASBOE-HANSEN G., 1973.- New Method for Quantitative Determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, Vol. 54: 484-489.
- 21.- 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 de Doctorat De l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algerie: 2p.
- 22.- BOUAL Z., KEMASSI A., HAMID OUDJANA A., MICHAUD P, OULD EL HADJ M. D., 2013a.- Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* L. (Malvaceae): activité périodique. *Lebanese Science Journal*, Vol. 14 (2) : 41-51.
- 23.- BOUAL Z., KEMASSI A., MICHAUD P., OULD EL HADJ M. D., 2011.- Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*asphodelustenuifoliuscavan* (liliaceae): effet prébiotique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides. *Algerian journal of arid environment*, Vol. 1: 52-60.
- 24.- BOURGOUGNON N., LAHAYE M., QUEMENER B., CHERMANN J-C., RIMBERT M., CORMACI M., FURNARI G., Kornprobst J-M., 1996.- Annual variation in composition

andin vitro anti-HIV-1 activity of the sulfated glucuronogalactan from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Applied Phycology*, Vol.8: 155-161.

25.- 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.

26.- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. BERSET C., 1995.- Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*, Vol. 28: 25-30.

27.- BROWNLEE I. A., 2011- The physiological roles of dietary fibre. *Food Hydrocolloids*. Vol:25, 238-250.

28.- 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: 193p.

29.- BRUNETON J., 2009.- Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales 4^{ème} édition. Paris, France: p50.

30.-BURMESTER G. R. et ANTONIO P., 2000.- Atlas de poche d'immunologie, 1^{ère} Edition. Ed. Flammarion, Paris: 39p.

31.-BURNAT B., WALKOWIAK-PRZYBYŁO M., BŁASZCZYK T., KLIMEK L., 2013.- Corrosion behaviour of polished and sandblasted titanium alloys in PBS solution. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, Vol.15 (1): 87-95.

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

33.- CARLUCCI M. J., PUJOL C. A., CIANCIA M., NOSEDA M., MATULEWICZ M. C., DAMONTE E.B., CEREZO A. S., 1997.- Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 20:97-105.

34.- CHAABI M., 2008.-Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. et Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de Doctorat en de l'Université Louis Pasteur. Constantine, Algerie: 18-24p.

35.- 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.

- 36.- CHENA M. L., WU S., TSAI T. C., WANG L. K., TSAI F. M., 2014.- Regulation of neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli* by antipsychotic drug. *International Immunopharmacology*, Vol. 23: 550-557.
- 37.- CHENG Y., JIA G., JIANG-SHENG Z., 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.
- 38.-CHIU L.C-M., ZHU W., OOI V. E-C., 2004.-A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* down regulates the expression of herpes simplex virus antigen in Vero cells. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.93:63-68.
- 39.- CHUAN-LI L., WEI Z., MIN W., MENG-MEI H., WEN-LONG C., XIAO-JIE X., CHUAN-JIAN L., 2015.-Polysaccharides from *Smilax glabra* inhibit the pro-inflammatory mediators via ERK1/2 and JNK pathways in LPS-induced RAW264.7 cells. *Carbohydrate Polymers*, Vol.122: 428-436.
- 40.- CZUPRYNSKI C. J., NOEL E. J., 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
- 41.- DALMAU A., GUIÑÓN PINA V., DEVESA F., AMIGÓ V., 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.
- 42.-DAVID J. H., et HAZEL P., 1998.- Analytical biochemistry, 3ème Edition. Ed. Prentice Hall, Angleterre: 336.
- 43.- DE SOUZA M.C.R., MARQUES C.T., DORE C.M.G., DA SILVA F.R.F., ROCHA H.A.O., LEITE E.L., 2007.- Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, Vol.19: 153-160.
- 44.- DELATTRE C., 2005.- Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes.Thèse Doctorat de l'Université De Picardie Jules Verne, Amiens: 52-83p.
- 45.- DESHMUKHA A. S., SETTYB C. M., BADIGERC A. M., MURALIKRISHNA K.S. 2012.-Gum ghatti: A promising polysaccharide for pharmaceutical applications. *Carbohydrate Polymers*, Vol.87:980- 986.
- 46.- 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*, Vol. 7: 1073-1080.
- 47.- DIEZ M., ISTASSE L., 1996.- Chapitre 1: fibre alimentaire chez le chien: définition et composition chimique. *Revue de la littérature*, Vol.140:385-391.
- 48.- DROUIN P., BLICKLE J. F., CHARBONNEL B., ESCHWEGE E., GUILLAUSSEAU P. J., PLOUIN P. F., DANINOS J. M., BALARAC N., SAUVANET J. P., 1999.- Diagnostic

et classification du diabète sucré les nouveaux critères. Rapport des experts de l'ALFEDIAM, vol. 25:83p.

49.- 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.

50.- DUNCAN C.J., PUGH N., PASCO D.S., ROSS S.A., 2002.- Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta* Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol.50: 5683–5685.

51.- EBRINGEROVA A., KARDOSOVA A., HROMADKOVA Z. HRIBALOVA V., 2003.- Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. Fitoterapia, vol. 74: 52-61.

52.- EDVARD C. I. S., HAMMARSTROM L. L. G., 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.

53.- EHLERS D., ZOSEL B., MOHRIG W., KAUSCHKE E., et EHLERS M., 1992.- Comparison of in vivo and in vitro phagocytosis in *Galleria mellonella* L. Parasitol Res, Vol.78: 354-359.

54.- EL-BOSHY M. E., EL-ASHRAM A. M., ABDELHAMID F.M., GADALLA H. A., 2010.- Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, Vol.28:802-808.

55.- ERBEKEN D., DIERCKX S., DEWETTINCK K., 2003.- Exudate gums: occurrence, production, and applications. Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol. 63; 10-21.

56.- FELLER C., JEANSON G. P., BONALY P.,1991.- Comparaison de différentes méthodes d'hydrolyse acide en vue du dosage des glucides totaux dans les sols. SCIENCE DU SOL, Vol. 29:13-22.

57.- FREIRE-GARABAL M., NUNEZ M.J., FERNANDEZ-RIAL J.C., COUCEIRO J., GARCIA-VALLEJO L., REY-MENDEZ M., 1993.- Phagocytic activity in stressed mice: effects of alprazolam. Ressources in Immunology, Vol. 144: 311-316.

58.- GHAYEMPOUR S., MONTAZER M., RAD M. M., 2015.-Tragacanth gum as a natural polymeric wall for producing antimicrobial nanocapsules loaded with plant extract. International Journal of Biological Macromolecules, Vol.81: 514–520.

59.-GHEBREGZABEIER M., RUFINI S., MONALDI B., et LATO M., 1975.- Thin-layer chromatography of carbohydrates. Chromatography, Vol. 127: 133-162.

- 60.- GHONEUM M., 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.
- 61.-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.
- 62.- GIESEA E. C., GASCON J., ANZELMO G., BARBOSA A. M., ALVES DA CUNHA M. A., DEKKER R. F.H., 2015.- Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other -D-glucans. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 72: 125-130.
- 63.- GODIN B., AGNEESSENS R., GOFFLOT S. LAMAUDIÈRE S., SINNAEVE G., GERIN P.A., DELCARTE J., 2011.- Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasse lignocellulosiques. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, Vol.15(1):165-182.
- 64.- GUERRA DORE C. M. P., FAUSTINO ALVES M. G. C., POFÍRIO WILLA L. S. E., COSTA T. G., SABRY D. A., DE SOUZA RÊGO L. A. R., ACCARDO C. M. ,ROCHA H. A. O., FILGUEIRA L. G. A., LEITE E. L., 2013.- A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 91: 1467–475.
- 65.- GUÍÑÓN PINA V., DALMAU A., DEVESA F., AMIGÓ V., 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.
- 66.- GUO R., CAO N., WU Y., WU J., 2016.-Optimized extraction and molecular characterization of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.82:231-242.
- 67.- GUPTA S., ABU-GHANNAM N., 2011.-Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 22: 315–326.
- 68.- HA T.J., Lee J.H., Lee M-H., Lee B.W., Kwon H.S., Park C-H., Shim K-B., Kim H-T., Baek I-Y., Jang D.S., 2012.-Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -D-glucosidase and aldose reductase. *Food Chemistry*, Vol.135:1397-1403.
- 69.- HAN N. S., ROBYT J. F. 1998.- Separation and detection of sugars and alditols on thin layer chromatograms. *Carbohydrate Research*, Vol.313: 135-137.
- 70.- HANKS J. H. 1975.- Hanks' balanced salt solution and ph control. *Tissue culture association*: 3-4.
- 71.-HANUS L.O., REZANKA T., DEMBITSKY V. M., A MOUSSAIEFF, 2005. - MYRRH - COMMIPHORA CHEMISTRY. *Biomedical Papers*, Vol: 149(1), 3-28.

- 72.- HARUN N. H., SEPTAMA A. W., JANTAN I., 2015.- Immunomodulatory effects of selected Malaysian plants on the CD18/11a expression and phagocytosis activities of leukocytes. *Asian Pac J Trop Biomed*, Vol. 5 (1): 48-53.
- 73.- HE Z., LIANG F., ZHANG Y., PAN Y., 2014.- Water-soluble polysaccharides from finger citron fruits (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*). *Carbohydrate Research*, Vol. 388: 100-104.
- 74.- HEAKAL F. E., SHEHATA O.S., TANTAWY N.S., 2014.- Degradation behaviour of AZ80E magnesium alloy exposed to phosphate buffer saline medium. *Corrosion Science*, Vol. 86: 285-294.
- 75.- HEMMINGSON J.A., FALSHAW R., FURNEAUX R.H., THOMPSON K., 2006.- Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology*, Vol.18:185–193.
- 76.- HERLINA , LINDRIATI T., PRAPTININGSIH Y., SUCIANI C. M., 2016.-Use of Crude Extract Water-Soluble Polysaccharides of Durian (*Durio zibethinus* Murr) Seeds as Stabilizer for Pineapple Juice Production. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, Vol.9:440- 449.
- 77.- 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.
- 78.-HOUGH L., JONES J. K. N., WADMAN W. H., 1952.- Some Observations on the Constitution of Gum Myrrh. *Journal of the Chemical Society*, 796-800.
- 79.- IBRAHIM M.A., KOHN N., WAPNIR R.A., 2004.- Proabsorptive effect of gum arabic in isotonic solutions orally administered to rats: effect on zinc and other solutes. *J. Nutr. Biochem*, Vol.15: 185-189.
- 80.- ISLAM A.M., PHILLIPS G.O., SLJIVO M.J., WILLIAMS P.A., 1997. - A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocoll*, Vol. 11: 493-505.
- 81.- JIN M., HUANG Q., ZHAO K., SHANG P., 2013.- Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 54:16-23
- 82.- JOHANSSON L., VIRKKI L., ANTTILA H., ESSELSTROM H., TUOMAINEN P., SONTAG-STROHM T., 2006.- Hydrolysis of β -glucan. *Food Chemistry*, Vol.97:71–79.
- 83.- KACZMARCZYK M. M., MILLER M. J., FREUND G. G., 2012.- The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism: clinical and experimental*, Vol. 61: 1058-106.

- 84.- KARAMALLA K.A., SIDDIG N.E., OSMAN M.E., 1998.- Analytical data for *Acacia senegal* va. *senegal* gum samples collected between 1993 and 1995 from Sudan. Food Hydrocoll. 12, 373–378.
- 85.-KARUNARATNE D. N., BELEIRH R.G.U., KARUNARATNE V., 2012.- Polysaccharides de lichen. Université de Peradeniya, Sri Lanka.p50.
- 76.- KENDALL C. W., ESFAHANI A., JENKINS D. J., 2012.- The link between dietary fibre and human health. Food Hydrocolloids, Vol.24:42-48.
- 87.- KOKO W.S., MESAİK M. A., YOUSAF S., GALAL M., CHOUDHARY M. I., 2008.- *In vitro* immunomodulating properties of selected Sudanese medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 118: 26-34.
- 88.-LE ROUX K., 2012.-Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé. Thèse de Doctorat de l'université de Nantes en Biochimie et biotechnologie des produits marins. Nantes, France: p60.
- 89.- LEIRO C. A. J. M., CASTRO R., ARRANZ J. A., LAMAS J., 2007.- Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida*, International Immunopharmacology. Vol.7: 879–888.
- 90.- LEUNG, M. Y. K., LIU, C., KOON, J. C. M., FUNG, K. P., 2006.- Polysaccharide biological response modifiers. Immunol. Lett., Vol.(105) 101-114.
- 91.- LI H-Y., SUN S-N., ZHOU X., PENG F., SUN R-C., 2015.- Structural characterization of hemicelluloses and topo chemical changes in Eucalyptus cell wall during alkali ethanol treatment. Carbohydrate Polymers, Vol. 123: 17-26.
- 92.- LIU J., WILLFOR S., XU C., 2015.- A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre 5, Vol. 5:3 1–6 1.
- 93.- LOWRY O. H., ROSEBROUGH J N., FARR L A. RANDALL R J., 1951.- Protein measurement with the folin phenol reagent. The journal of biological chemistry, vol. 193:265-275.
- 94.- MA L., GAN D., WANG M., ZHANG Z., JIANG C., ZENG X, 2012.-Optimization of extraction, preliminary characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Stachys floridana* Schuttl.ex Benth. Carbohydrate Polymers, vol.87:1390-1398.
- 95.- MAQBOOL M., VIDYADARAN S., GEORGE E., RAMASAMY R., 2011.- Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. Med J Malaysia, Vol. 66 (4): 296-299.

- 96.- MARTINICHEN-HERRERO J.C., CARBONERO E.R., SASSAKI G.L., GORIN P.A.J., IACOMINI M., 2005.- Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 35(1-2):97-102.
- 97.- MAXWELLA E. G., COLQUHOUNA I. J., CHAUB H. K., HOTCHKISSB A. T., WALDRONA K. W., MORRISA V. J., BELSHAWA N. J., 2016.-Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains. Carbohydrate Polymers, Vol.136: 923-929.
- 98.- MELLINGER C. G., CARBONERO E. R., CIPRIANI T. R., GORIN P. A. J., IACOMINI M., 2005-Xylans from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. Journal of Natural Products, vol. 68: 129–132.
- 99.- MELLINGER C. G., CARBONERO E. R., CIPRIANI T. R., GORIN P. A. J., IACOMINI M., 2005.-Xylans from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. Journal of Natural Products, Vol. 68: 129-132.
- 100.- MENG L., SUN S., Li R., SHEN Z., WANG P., et JIANG X., 2015.- Antioxidant activity of polysaccharides produced by *Hirsutella* sp. and relation with their chemical characteristics. Carbohydrate Polymers, vol. 117: 452-457.
- 101.- MERCK K., 2008.- May-Grünwald en solution d'éosine-bleu de méthylène. Dispositif médical de diagnostic in vitro. Allemagne.
- 102.-MOINFAR F.,SPIELER P., RÖSSLE R.,2012.- Nongynecologic Cytopathology: A Practical Guide. Ed. Springer Science & Business Media, London: 177p.
- 103.- MONSIGNY M., CLAIRE P. ROCHE A., 1988.- Calorimetric Determination of Neutral Sugars by a Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod. Analytical Biochemistry, Vol. 175: 525-530.
- 104.- MOREL A., LECOQ G., MENNINGER D. J., 2012.-Evaluation de la prise en charge du diabète Tome1. Membres de l'Inspection générale des affaires sociales, France: 249.
- 105.- MORRISON I. M , STEWART D., 1998.- Plant cell wall fragments released on solubilisation in trifluoroacetic acid. Phytochemistry, vol. 49 (6): 1555-1563.
- 106.-MORETAO M. P., BUCHI D. F., GORIN P.A.J., IACOMINI M., OLIVEIRA M. B.M.,2003.- Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. Immunology Letters, Vol. 89:175-185.
- 107.- MOSIHUZZMAN M., S. NAHEED, HAREEM S., TALIB S., SHAMSUN G. A., KHAN N., CHOUDHARY M. I., SENER B., TAREEN R. B., ISRAR M.,2013.- Studies on α -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis*. Life Sciences, Vol.92 :187-192.

- 108.- MOURADI A., CHIKHAOUI-KHAY M., AITAKKI S., AKALLAL R., HRRIMLE I., GIVERNAUD T., 2006.- Analyse structurale des fractions polysaccharidiques extraites de la paroi cellulaire d'*Hypneamusciformis* (Rhodophyceae, Gigartinales). *Afrique SCIENCE*, Vol. 02 (2): 226-244.
- 109.- 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.
- 110.- 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.
- 111.- NERGARD C S., DIALLO D., INNGJERDINGEN K., MICHAELSEN T E., MATSUMOTO T., KIYOHARA H., YAMADA H., 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.
- 112.- NGO D-H., KIM S-K., 2013.- Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 62: 70–75.
- 113.- NIE S., CUI S. W., XIE M., PHILLIPS A. O., PHILLIPS G. O., 2013.- Bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis*: Isolation, structure features and bioactivities. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 1, Vol.38 – 52.
- 114.- NORUM M., BOGWALD J., DALMO R. A., 2005.-Isolation and characterisation of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) macrophages, vol. 18: 381-391.
- 115.- NOSE M., TERAWAKI K., OGIHARA Y., 1997.- The role of a crude polysaccharide fraction in the macrophage activation by "Shosaikoto". *Phytomedicine*, Vol. 4 (1): 23-26.
- 116.- OLAFSDOTTIR E.S., INGOLFSDOTTIR K., 2001.-Polysaccharidesfrom lichens: Structural characteristics and biological activity. *Planta Medica*, Vol.67 (3): 199–208.
- 117.-PAULSEN B. S., OLAFSDOTTIR E. S., INGOLFSDOTTIR K., 2002.- Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. *Journal of Chromatography A*, Vol.967:163–171.
- 118.- PINTO P. C.A.G., SARAIVA M. L. M.F.S., REIS S., et LIMA J. L.F.C., 2005.- Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2,2 –azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis. *Analytica ChimicaActa*, vol. 531: 25-32 .
- 119.- POPOV S. V., POPOVA G. Y., OVODOVA R. G., BUSHNEVA O. A., OVODOV Y. S., 1999.- Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 21: 617-624.

- 120.- PRAJAPATI V. D., MAHERIYA P. M., JANI G. K., SOLANKI H. K., 2014.- Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 105: 97-112.
- 121.- QIAN H.F. , CUI S.W. , WANG Q. , WANG C., ZHOU H.M., 2011.- Fractionation and physicochemical characterization of peach gum polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, Vol. 25:1285-1290.
- 122.- QIAN J-Y., BAI Y-Y., TANG J., CHEN W., 2015.- Antioxidation and α -glucosidase inhibitory activities of barley polysaccharides modified with sulfation. *LWT- Food Science and Technology*. Vol. 64:104-111.
- 123.- 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.
- 124.- RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICEEVANS C., 1999.- Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 26: 1231–1237
- 125.- ROSSI G., CAPITANI L., CECILIANI F., RESTELLI L., PALTRINIERI S., 2013.- Hyposialylated α 1-acid glycoprotein inhibits phagocytosis of feline neutrophils, *Research in Veterinary Science*, vol. 95:465-471.
- 126.- ROUËSSE J., 2002.- Cancer du sein: étape pré-thérapeutique. Ed. John Libbey Eurotext, Paris: 42p
- 127.- 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.
- 128.- SATO M., SANO H., 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.
- 129.- 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.
- 130.- SCHEPETKIN I. A., QUINN M. T., 2006.- Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, Vol.6:317–333.
- 131.- SCHEPETKIN I. A., XIE G., KIRPOTINA L. N., KLEIN R. A., JUTILA M. A., QUINN M. T, 2008.-Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. *International Immunopharmacology*, Vol.8:1455-1466.
- 132.- SEBAHOUN G., 2005- Hématologie clinique et biologique, 3^{ème} Edition. Ed. Arnette, France: 527p.

- 133.- SEBAHOUN G., 2005- Hématologie clinique et biologique, 3^{ème} Edition. Ed. Arnette, France: 527p.
- 134.- SENDL A., MULINACCI N., VINCIERIT T. F. F., et WAGNER H., 1993.- Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Sedum telephium*. *Phytochemistry*, vol: 34.
- 135.- SHAOA Q., DENG Y., LIU H., ZHANG A., HUANG Y., XU G., Mingyan LI M., 2014.- Essential oils extraction from *Anoectochilus roxburghii* using supercritical carbon dioxide and their antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, vol. 60: 104-112.
- 136.- SHEN T., LI G-H., WANG X-N., LOU H-X., 2012. - The genus *Commiphora*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 142, 319-330.
- 137.- SINGLETON V.L., ROSS J.A. 1965.-Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent, *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol.16 (3): 144-158.
- 138.- SINGTHONG J., NINGSANOND S., CUI S. W., 2009.- Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chemistry*, Vol.114:1301–1307.
- 139.- STEVEN M M., LENNIE S E., STURROCK R D., GEMMELL C G., 1984.- Enhanced bacterial phagocytosis by peripheral blood monocytes in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Vol: 43 (3):435-439.
- 140.- SU S., WANG T., DUAN J-A., ZHOU W., HU Y-Q., TANG Y-P, YU L., QIAN D-W., 2011. - Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol: 134, 251–258.
- 141.- SUÁREZ E.R., SYVITSKI R., KRALOVEC J.A., NOSEDA M.D., BARROW C.J., EWART H.S., LUMSDEN M.D., GRINDLEY T.B., 2006.- Immunostimulatory polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A new galactofuranan. Measurement of molecular weight and molecular weight dispersion by DOSY NMR. *Biomacromolecules*, Vol.8: 2368-76.
- 142.- TANG W., HEMM I., BERTRAM B., 2003a. - Recent development of antitumor agents from Chinese herbal medicines. PartII. High molecular compounds (3). *Planta Medica*, Vol.69(3):193–201.
- 143.- TANG W., HEMM I., BERTRAM B., 2003b.- Recent development of antitumor agents from Chinese herbal medicines; PartI. Low molecular compounds. *Planta Medica*, Vol. 69(2): 97-108.
- 144.- TAVANTI A., CAMPA D., BERTOZZI A., PARDINI G., NAGLIK J. R., BARALE R., SENESI S., 2006.- *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. *Microbes and Infection*, vol. 8:791-800.

- 145.- THAKUR M., WENG A., FUCH H., SHARMA V., BHARGAVA C.S., CHAUHAN N. S., DIXIT V. K., BHARGAVA S., 2012.- Rasayana properties of Ayurvedic herbs: Are polysaccharides a major contributor. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 87:13–15.
- 146.- THANGAM R., SATHUVAN M., POONGODI A., SURESH V., PAZHANICHAMY K., SIVASUBRAMANIAN S., KANIPANDIAN N., GANESAN N., RENGASAMY R., THIRUMURUGAN R., KANNAN S., 2014.-Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by *Cymbopogon Citratus* polysaccharide fractions. *Carbohydrate Polymers*, Vol.107:138–150.
- 147.- TIPTON D.A., HAMMAN N.R., DABBOUS M.K., 2006.-Effet of myrrh oil on IL-1 stimulation of NF- κ B activation and PGE₂ production in human gingival fibroblasts and epithelial cells *Toxicology in Vitro*, Vol.20:248-255.
- 148.-TOURATIER C., 1992.- Comportement des protéines sarcoplasmiques de la viande de porc au cours du stockage et du chauffage. Relations avec la qualité de la viande. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine, France: p51.
- 149.-VASILE F. E., MARTINEZ M. J., RUIZ-HENESTROSA V. M. P., JUDIS M. A., MAZZOBRE M. F., 2016.- Physicochemical, interfacial and emulsifying properties of a nonconventional exudate gum (*Prosopis alba*) in comparison with gum arabic .*Food Hydrocolloids*, Vol.56: 245-253.
- 150.- Vo T-S., Ngo D-H., Ta Q. V., Kim S-K., 2011.-Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.44: 11-20.
- 151.- WANG J., GE B., LIE Z., GUAN F., LIE F., 2016.- Structural analysis and immunoregulation activity comparison of five polysaccharides from *Angelica sinensis*. *Carbohydrate Polymers*, Vol.140: 6-12.
- 152.- WANG K-P., WANG J., LI Q., ZHANG Q-L., YOU R-X., CHENG Y., LUO L., ZHANG Y., 2014.-Structural differences and conformational characterization of five bioactive polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Food Research International*, Vol.62: 223–232.
- 153.- WANG P., LI S., ZHOU T., GAN R-Y., ZHANG P., LI H-B., 2016.- Resources and Bioactivities of Polysaccharides. *International Journal of Traditional and Natural Medicines*, Vol.6 (1): 1-8.
- 154.- WANG Q., FANG Y., 2004.- Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography b*, vol. 812: 309–324.

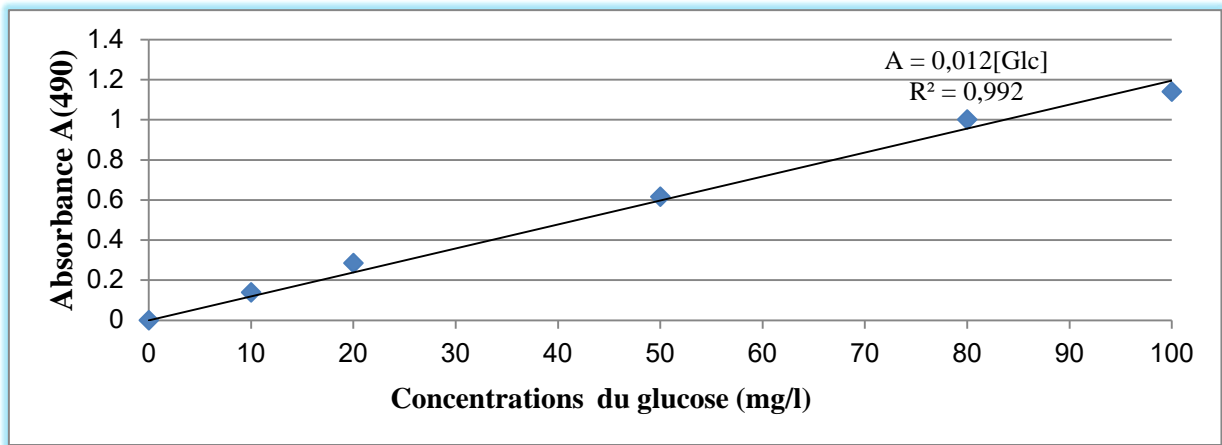
- 155.- WANG Z. B., PEI J. J., MA H. L., CAI P. F., et YAN J. K., 2014.- Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinuslinteus* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, vol. 109: 49-55.
- 156.- WARRAND J., 2004.- Etude structurale et propriétés en solution des polysaccharides constitutifs du mucilage de lin (*Linum usitatissimum*).Thèse Doctorat de l'Université Picardie Jules Verne,Amien cedex: 79-80p.
- 157.- WATSON R. R. PREEDY V. R., 2013.-Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases: Bioactive Food in Chronic Disease States 1^{ère} Edition. Ed. Academic Press, USA: 247p.
- 158.- WIJESKARA I., PANGESTUTI R., KIM S-K., 2011.-Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, Vol.84: 14-21.
- 159.- WIJESINGHE I. W.A.J.P., JEON Y-J., 2012.-Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, Vol.88:13-20.
- 160.- WILDEMANN B. OSCHMANN P., 2011.-Laboratory Diagnosis in Neurology. Ed. Thieme, USA.
- 161.- WU J., SHI S., WANG H., WANG S., 2016.- Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review. *Carbohydrate Polymers*, Vol.144: 474-494.
- 162.- XIE G. Q., QIN F. X., ZHU S. L., 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.
- 163.- XIE G., QIN F., ZHU S., et LOUZGUINE-LUGZIN D.V., 2014b.- Corrosion behaviour of porous Ni-free Ti-based bulk metallic glass produced by spark plasma sintering in Hanks' solution. *Intermetallics*, Vol. 44: 55-59..
- 164.- XIE J. H., SHEN M. Y., NIE S. P., ZHAO Q., LI C., et XIE M. Y., 2014a.- Separation of water-soluble polysaccharides from *Cyclocarya paliurus*by ultrafiltration process. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 101:479-483.
- 165.- XU H., ZHANG Y., ZHANG J., CHEN D., 2007.- Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii*. *International Immunopharmacology*, Vol.7:175-182.
- 166.- XU P., WU J., ZHANG Y., CHEN H., WANG Y., 2014.- Physicochemical characterization of puerh tea polysaccharides and their antioxidant and α -glucosidase inhibition. *Journal of Functional Foods*, Vol. 6: 545-554.

- 167.- XUE C., YU G., HIRATA T., TERAOKA J., LIN H., 1998.- Antioxidative Activities of Several Marine Polysaccharides Evaluated in a Phosphatidylcholine-liposomal Suspension and Organic Solvents. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol.62: 206-209.
- 168.- YAMADA H., NAGAI T., CYONG J. C., et OTSUKA Y., 1986.- Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, plantago-mucilage from the seed of *Plantago asiatica*. *Carbohydrate Research*, Vol. 56: 137-145 .
- 169.- YANG L., ZHANG L-M., 2009.- Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, Vol.76: 349-361.
- 170.- ZHANG J. G., LIU Q., LIU Z. L., LI L., YI L. T., 2015.- Anti hyperglycemic activity of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 164: 180-185.
- 171.- ZHANG S., LI X-Z., 2015.-Inhibition of α -D-glucosidase by polysaccharides from the fruit hull of *Camellia oleifera* Abel, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 115: 38-43.
- 172.- ZHANG W., HE H., ZHANG X., 2007.- Determination of neutral sugars in soil by capillary gas chromatography after derivatization to aldonitrile acetates. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 39: 2665–2669.
- 173.- ZHANG X., LIU L., LIN C., 2014.-Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste, *Food Hydrocolloids*, vol. 39:10-18.
- 174.- ZHANG Z., QUANBIN Z., WANG J., SONG H., Zhang H., NIU X., 2010.- Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, Vol.79:1124–1129.
- 175.- ZHU J., LIU W., YU J., ZOU S., WANG J., YAO W., GAO X., 2013-Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 98:8-16.
- 176.- 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 α -D-glucosidase inhibition of polysaccharide from *Astragalus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol.87:570-576.
- 177.- ZONG A., CAO H., et WANG F., 2012.- Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, Vol.90:1395-1410.

Annexes

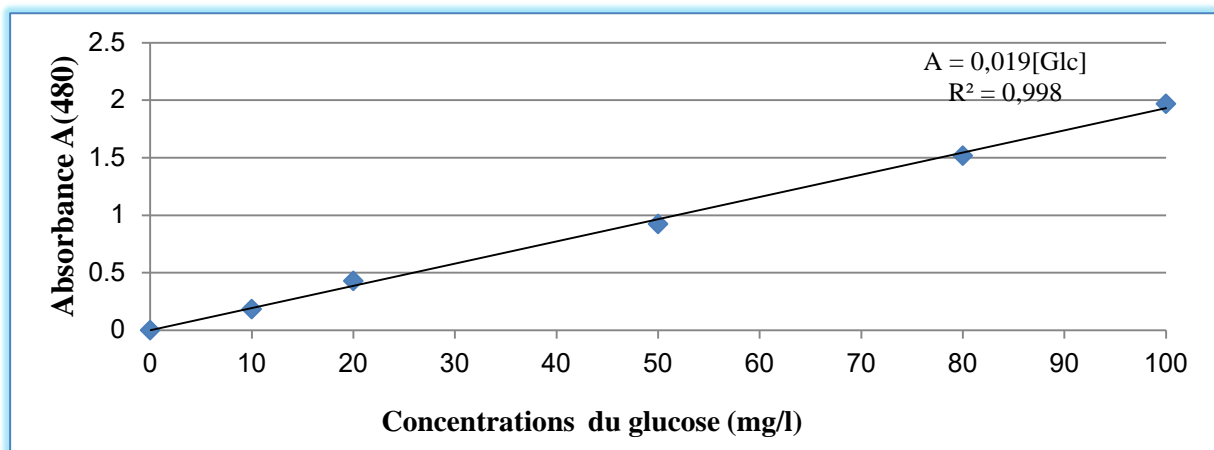
Annexe 01

Courbe d'étalonnage des oses totaux



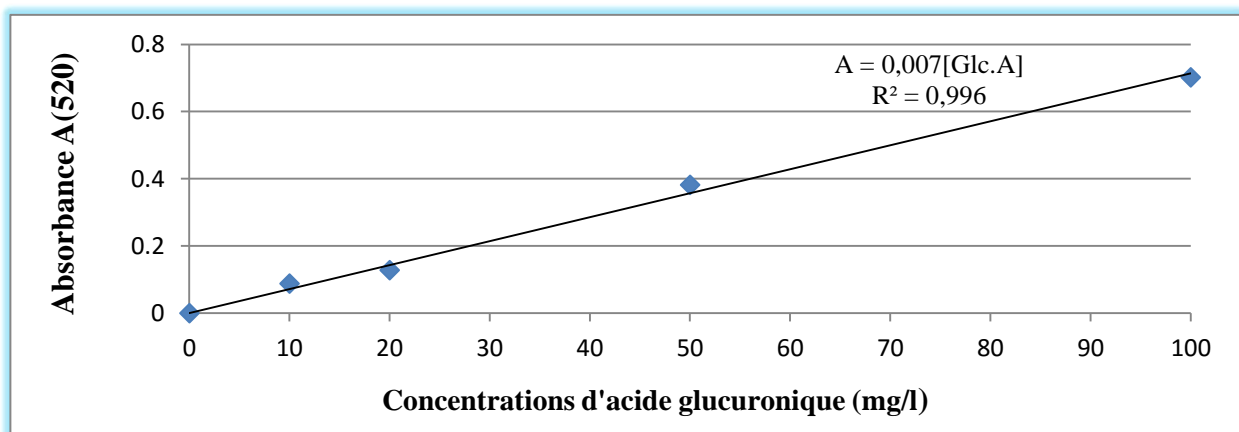
Annexe 02

Courbe d'étalonnage des oses neutres



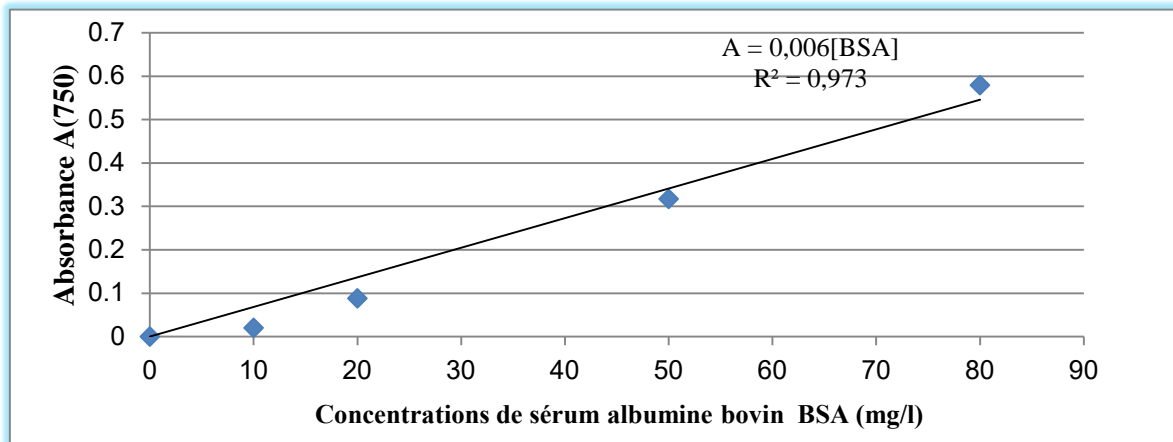
Annexe 03

Courbe d'étalonnage des oses acides



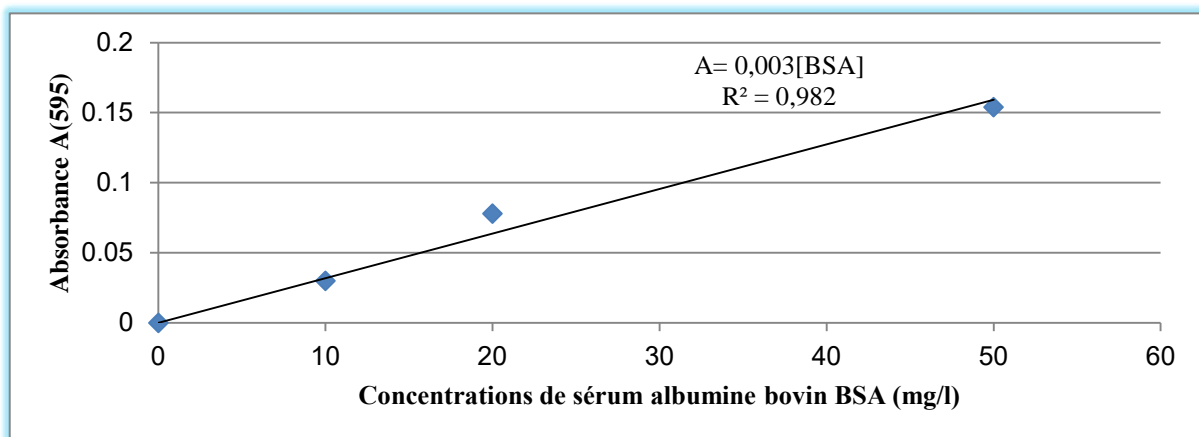
Annexe 04

Courbe d'étalonnage des protéines selon la méthode de LOWRY



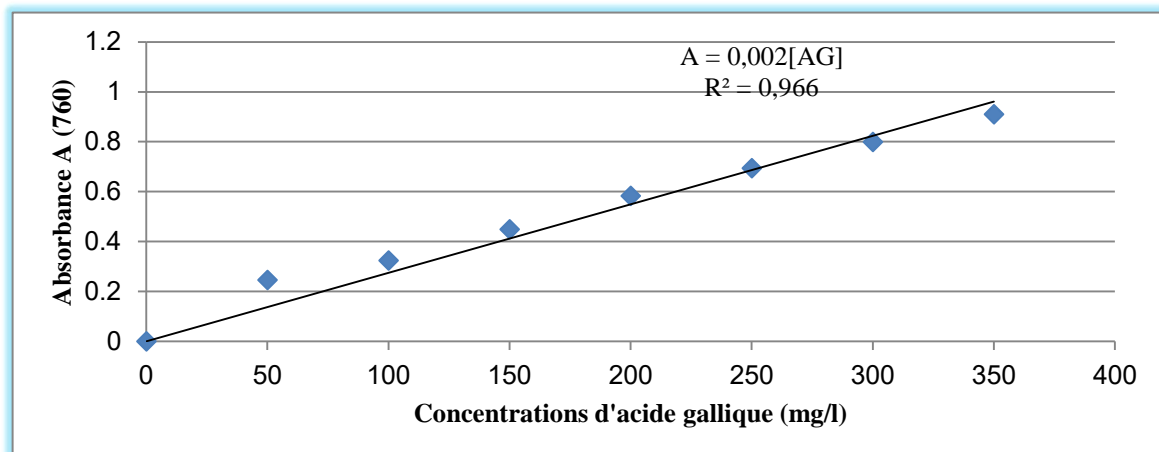
Annexe 05

Courbe d'étalonnage des protéines selon la méthode de BRADFORD



Annexe 06

Courbe d'étalonnage des polyphénols



Annexe 05

Préparation des solutions utilisées au cours de l'expérience (solution TFA, solution TPTZ et tampon acétate)

Solution	Préparation
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 ⁻¹ P : Pureté = 99% D : Densité = 1,5351 C : Concentration $C_1 = P \times D \times 10 / M = (99) \times (1,5351) \times (10) / 114,02 = 13,32 \text{ M}$ La préparation de 50 ml de solution TFA 2 M est se faite selon la loi : $C_1 V_1 = C_2 V_2 \longrightarrow V_1 = C_2 V_2 / C_1$ $V_1 = (50 \text{ ml}) \times (2 \text{ M}) / 13,32 \text{ M} = 7,51 \text{ ml de TFA}$
Solution TPTZ	Mélanger 1 ml d'une solution de FeCl ₃ .6H ₂ O à 20 mM dans 100 ml d'HCl à 40 mM
Tampon acétate	Dissoudre 2,46 g acétate de sodium dans 3,6 ml acide acétique et ajuster le volume jusqu'à 100 ml par l'eau distillée

Résumés

**Contribution à l'étude des polysaccharides issus de la gomme *Commiphora myrrha*
Nees. (BURSERACEAE)**

Résumé

Ce travail est conçu pour déterminer la composition chimique et de caractériser l'extrait polysaccharidique issus de la gomme *Commiphora myrrha* (BURSERACEAE), une plante médicinale récoltée de la région de Tamanrasset et de tester leur activité anti diabétique, anti oxydante, et phagocytaire. La gomme est prétraitée par éthanol puis macéré dans l'eau distillée à 80°C pendant 2h. Les polysaccharides sont précipités par acétone, puis lyophilisés. Le rendement massique d'extraction des polysaccharides hydrosolubles est de 36,84%. L'étude de la composition chimique de l'extrait polysaccharidique montre $48,57 \pm 2,63\%$ d'oses totaux, $42,50 \pm 0,66\%$ d'oses neutres, $6,43 \pm 1,54\%$ d'oses acides et $29,96 \pm 7,37\%$ des protéines. Il apparaît que l'extrait polysaccharidique de la gomme est constitué des hétéro-polysaccharides. Les analyses chromatographiques en utilisant quatre systèmes de chromatographie sur couche mince révèlent que les polysaccharides de la gomme sont constitués principalement d'arabinose, de galactose, et d'acide glucuronique, cela indique la présence d'un galactoarabinane. La composition structurale des polysaccharides de la gomme, permet d'espérer un large spectre de propriétés biologiques. L'étude de l'activité anti-diabétique des polysaccharides, porte sur la détermination de leur pouvoir inhibitrice de l'enzyme α -D-glucosidase. L'étude a montré que l'extrait des polysaccharides a un faible pouvoir inhibiteur de l' α -D-glucosidase de 9,9% pour une concentration maximale de 100 mg/l, en comparaison à l'acarbose comme contrôle positif qui a un fort pouvoir inhibiteur de 100% à partir de la concentration 12,91mg/l. L'activité anti oxydante est évaluée par deux tests ABTS et DPPH dont un faible pouvoir inhibiteur des radicaux libres est signalé. Dans le but d'étudier l'effet immuno-modulateur des extraits polysaccharidiques, la phagocytose de *Candida albicans*, levure pathogène opportuniste, par des leucocytes humaines opsonisées en présence des polysaccharides, est évaluée. L'étude a montré que l'extrait de polysaccharide de la gomme a une activité phagocytaire appréciable de 12,33 %. Le contrôle positif montre une activité phagocytaire de 18%. Les résultats de ce travail a confirmé l'effet immuno-modulatrice des polysaccharides en améliorant l'activité phagocytaire des leucocytes. Ce qui peut expliquer l'utilisation de la myrrhe dans la médecine traditionnelle par exemple dans les cas des infections de la peau et cicatrisation des blessures.

Mots clés: polysaccharides, la gomme *Commiphora myrrha*, anti diabétique, phagocytaire, anti oxydant.

**Contribution to the study of polysaccharides from *Commiphora myrrha* Nees. gum
(BURSERACEAE).**

Abstract

This study is designed to determine the chemical composition and characterization of polysaccharide extract from the *Commiphora myrrha* gum, plant used in traditional medicine harvested from Tamanrasset and tests their anti-diabetic, and anti-oxidant, phagocytosis activities. These polysaccharides were obtained by elimination of the ethanol extract and sequential extraction in distilled water, followed by precipitation in acetone. The yield of extract is of 36,84%. The study of the chemical composition of the water-soluble polysaccharide extracts shows $48,57 \pm 2,63\%$ of carbohydrates, $42,50 \pm 0,66\%$ of neutral mono-saccharides, $6,43 \pm 1,54\%$ acidic mono-saccharides and $29,96 \pm 7,37\%$ of proteins. The study of the composition of mono-saccharides by thin layer chromatography after the hydrolysis with TFA 2 M during 4 hours at 110°C indicates the presence of arabinose, galactose, glucuronic acid. The remarkable diversity in hydro-soluble polysaccharides structure gives a hope for a large range of biological properties. The study of anti-diabetic activity showed that the water-soluble polysaccharide extracts has low inhibitor ability of α -D-glucosidase enzyme 9,9% to a maximum concentration of 100 mg /l, compared to acarbose as a positive control that has a high inhibiting ability of 100% from the concentration 12,91 mg / l. Whoever, the antioxidant activity is targeted by the measure of the scavenging capacity of free radicals by DPPH and ABTS tests. The resultants showed that the scavenging capacity of polysaccharides is low in the range of concentrations tested. In order to study the immunomodulatory effect of the polysaccharides extracts, it was examined the reaction of opsonized human leucocytes in the presence of polysaccharides against phagocytosis of *Candida Albicans* which is opportunistic pathogen yeast. The polysaccharides present an appreciable phagocytic activity of 12%. The positive control shows phagocytic activity of 18%. The results of this work provide new knowledge in the field of biological activities of polysaccharides of *Commiphora myrrha* gum and justify its use in the traditional medicine as skin infections and wound cicatrizing.

Keywords: Polysaccharides, *Commiphora myrrha* gum, Anti diabetic, Antioxidant, phagocytosis.

مساهمة في دراسة السكريات المتعددة المستخلصة من صمغ نبات *Commiphora myrrha* Nees.
(BURSERACEAE)

الملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة السكريات المتعددة المستخلصة من صمغ *Commiphora myrrha* ، والتي تم جمعها من صحراء الجزائر وهي ذات طابع طبي مستخدمة في الطب التقليدي. تم نقع صمغ *Commiphora myrrha* في الماء المقطر وهذا في درجة حرارة 80 درجة مئوية خلال ساعتين من الزمن بغرض استخلاص السكريات المتعددة للصمغ .
Commiphora myrrha المرود الكتلي للسكريات المتعددة المستخلصة قدر بنسبة 36,84% بينت دراسة التركيبية للسكريات المتعددة المستخلصة ان السكريات الكلية تمثل نسبة $48,57 \pm 2,63\%$ ،بينما تمثل المعتدلة نسبة $42,50 \pm 0,66\%$ ، اما الحمضية فتمثل نسبة $6,43 \pm 1,54\%$ ،كذا نسبة البروتينات تمثل $29,96 \pm 7,37\%$. كما أظهرت دراسة تركيبية السكريات المتعددة المستخلصة من حيث السكريات البسيطة بعد تحليلها بفعل حمض TFA بتركيز 2مول/ل مدة أربع ساعات في 110 درجة مئوية باستعمال كروماتوغرافية على الصفائح الرقيقة احتواءها على الارابينوز، غلكتوز ، اسيد جلوكوغونيك. زيادة على ذلك فإن التنوع الملاحظ في تركيبية السكريات المتعددة يرجح تميزها بخصائص بيولوجية هامة. أظهرت دراسة خاصة مضاد للسكري و التي تعتمد على دراسة قدرة السكريات المتعددة المستخلصة على إيقاف نشاط أنزيم α -D-glucosidase ، ان هاته السكريات لها قدرة منخفضة على إيقاف نشاط الأنزيم حيث يلاحظ قدرة قصوى بنسبة 9,9% في التركيز 100مغ/ل . أيضا، تمت دراسة خاصة المضادة للأكسدة باستعمال اختبارين ABTS و DPPH . أظهرت النتائج أن للسكريات المتعددة المستخلصة قدرة منخفضة في مجال التركيز المختبر. بهدف تحديد دور السكريات المتعددة في تعديل النظام المناعي تمت دراسة بلعمة الكانديدا *Candidaalbicans* وهي خميرة انتهازية ضارة، في وجود السكريات المتعددة . أظهرت النتائج أن متعدد السكريات المستخلص من صمغ *Commiphora myrrha* لديه نشاط بلعمة كبير 12,33%. بينما أظهر الشاهد الإيجابي نشاطا بلعيميا قدر بـ 18% . لقد مكنت نتائج هذه الدراسة من إضافة معارف جديدة فيما يتعلق بالأنشطة البيولوجية للسكريات المتعددة. المستخلصة من صمغ *Commiphora myrrha* كما مكنت من تأكيد استعمال الصمغ في الطب التقليدي كمضاد للجروح.

الكلمات المفتاحية : السكريات المتعددة ، صمغ *Commiphora myrrha* ، مضاد السكري ، مضاد الأكسدة، البلعمة.

Résumé

Ce travail est conçu pour déterminer la composition chimique et de caractériser l'extrait polysaccharidique issu de la gomme *Commiphora myrrha* (BURSERACEAE), une plante médicinale récoltée de la région de Tamanrasset et de tester leur activité anti diabétique, anti oxydante, et phagocytaire. La gomme est prétraitée par éthanol puis macéré dans l'eau distillée à 80°C pendant 2h. Les polysaccharides sont précipités par acétone, puis lyophilisés. Le rendement massique d'extraction des polysaccharides hydrosolubles est de 36,84%. L'étude de la composition chimique de l'extrait polysaccharidique montre 48,57±2,63% d'oses totaux, 42,50±0,66% d'oses neutres, 6,43±1,54% d'oses acides et 29,96±7,37% des protéines. Il apparaît que l'extrait polysaccharidique de la gomme est constitué des hétéro-polysaccharides. Les analyses chromatographiques en utilisant quatre systèmes de CCM révèlent que les polysaccharides de la gomme sont constitués principalement d'arabinose, de galactose, et d'acide glucuronique, cela indique la présence d'un galactoarabinane. La composition structurale des polysaccharides de la gomme, permet d'espérer un large spectre de propriétés biologiques. L'étude de l'activité anti-diabétique des polysaccharides, porte sur la détermination de leur pouvoir inhibitrice de l'enzyme α -D-glucosidase. L'étude a montré que l'extrait des polysaccharides a un faible pouvoir inhibiteur de l' α -D-glucosidase de 9,9% pour une concentration maximale de 100 mg/l, en comparaison à l'acarbose comme contrôle positif qui a un fort pouvoir inhibiteur de 100% à partir de la concentration 12,91mg/l. L'activité anti oxydante est évaluée par deux tests ABTS et DPPH dont un faible pouvoir inhibiteur des radicaux libres est signalé. Dans le but d'étudier l'effet immuno-modulateur des extraits polysaccharidiques, la phagocytose de *Candida albicans*, levure pathogène opportuniste, par des leucocytes humaines opsonisées en présence des polysaccharides, est évaluée. L'étude a montré que l'extrait de polysaccharide de la gomme a une activité phagocytaire appréciable de 12,33 %. Le contrôle positif montre une activité phagocytaire de 18%. Les résultats de ce travail a confirmé l'effet immuno-modulatrice des polysaccharides en améliorant l'activité phagocytaire des leucocytes. Ce qui peut expliquer l'utilisation de la myrrhe dans la médecine traditionnelle par exemple dans les cas des infections de la peau et cicatrisation des blessures.

Mots clés: Polysaccharides, la gomme *Commiphora myrrha*, anti diabétique, phagocytaire, anti oxydant.

Abstract

This study is designed to determine the chemical composition and characterization of polysaccharide extract from the *Commiphora myrrha* gum, plant used in traditional medicine harvested from Tamanrasset and tests their anti-diabetic, and anti-oxidant, phagocytosis activities. These polysaccharides were obtained by elimination of the ethanol extract and sequential extraction in distilled water, followed by precipitation in acetone. The yield of extract is of 36,84%. The study of the chemical composition of the water-soluble polysaccharide extracts shows 48,57±2,63% of carbohydrates, 42,50±0,66% of neutral mono-saccharides, 6,43±1,54% acidic mono-saccharides and 29,96±7,37% of proteins. The study of the composition of mono-saccharides by thin layer chromatography after the hydrolysis with TFA 2 M during 4 hours at 110°C indicates the presence of arabinose, galactose, glucuronic acid. The remarkable diversity in hydro-soluble polysaccharides structure gives a hope for a large range of biological properties. The study of anti-diabetic activity showed that the water-soluble polysaccharide extracts has low inhibitor ability of α -D-glucosidase enzyme 9,9% to a maximum concentration of 100 mg /l, compared to acarbose as a positive control that has a high inhibiting ability of 100% from the concentration 12,91 mg / l. Whoever, the antioxidant activity is targeted by the measure of the scavenging capacity of free radicals by DPPH and ABTS tests. The resultants showed that the scavenging capacity of polysaccharides is low in the range of concentrations tested. In order to study the immunomodulatory effect of the polysaccharides extracts, it was examined the reaction of opsonized human leucocytes in the presence of polysaccharides against phagocytosis of *Candida Albicans* which is opportunist pathogen yeast. The polysaccharides present an appreciable phagocytic activity of 12%. The positive control shows a phagocytic activity of 18%. The results of this work provide new knowledge in the field of biological activities of polysaccharides of *Commiphora myrrha* gum and justify its use in the traditional medicine as skin infections and wound cicatrizing.

Keywords: Polysaccharides, *Commiphora myrrha* gum, Anti diabetic, Antioxidant, phagocytosis.

المخلص

يهدف هذا العمل إلى دراسة السكريات المتعددة المستخلصة من صمغ *Commiphora myrrha* ، والتي تم جمعها من صحراء الجزائر . وهي ذات طابع طبي مستخدمة في الطب التقليدي. تم نفع صمغ *Commiphora myrrha* في الماء المقطر وهذا في درجة حرارة 80 درجة مئوية خلال ساعتين من الزمن بغرض استخلاص السكريات المتعددة للصمغ . *Commiphora myrrha* المرود الكتلي للسكريات المتعددة المستخلصة قدر بنسبة 36,84% بينت دراسة التركيبية للسكريات المتعددة المستخلصة ان السكريات الكلية تمثل نسبة 48,57±2,63% ،بينما تمثل المعتدلة نسبة 42,50±0,66% ، اما الحمضية فتمثل نسبة 6,43±1,54% ،كذا نسبة البروتينات تمثل 29,96±7,37% . كما أظهرت دراسة تركيبية السكريات المتعددة المستخلصة من حيث السكريات البسيطة بعد تحللها بفعل حمض TFA بتركيز 2مول/ل مدة أربع ساعات في 110 درجة مئوية باستعمال كروماتوغرافية على الصفائح الرقيقة احتواءها على الارابينوز ، غلكتوز ، اسيد جلوكورونيك . زيادة على ذلك فإن التنوع الملاحظ في تركيبية السكريات المتعددة يرجح تميزها بخصائص بيولوجية هامة. أظهرت دراسة خاصة مضاد للسكري و التي تعتمد على دراسة قدرة السكريات المتعددة المستخلصة على إيقاف نشاط أنزيم α -D-glucosidase ، ان هاته السكريات لها قدرة منخفضة على إيقاف نشاط الأنزيم حيث يلاحظ قدرة قصوى بنسبة 9,9 % في التركيز 100مغ/ل . أيضا، تمت دراسة خاصة المضادة للأكسدة باستعمال اختبارين ABTS و DPPH. أظهرت النتائج أن للسكريات المتعددة المستخلصة قدرة منخفضة في مجال التركيز المختبر . بهدف تحديد دور السكريات المتعددة في تعديل النظام المناعي تمت دراسة بلعمة الكانديدا *Candidaalbicans* وهي خميرة انتهائية ضارة، في وجود السكريات المتعددة . أظهرت النتائج أن متعدد السكريات المستخلص من صمغ *Commiphora myrrha* لديه نشاط بلعمة كبير 12,33 % . بينما أظهر الشاهد الإيجابي نشاطا بلعميا قدر بـ 18 % . لقد مكنت نتائج هذه الدراسة من إضافة معارف جديدة فيما يتعلق بالأنشطة البيولوجية للسكريات المتعددة المستخلصة من صمغ *Commiphora myrrha* كما مكنت من تأكيد استعمال الصمغ في الطب التقليدي كمضاد للجروح.

الكلمات المفتاحية : السكريات المتعددة ، صمغ *Commiphora myrrha* ، مضاد السكري ،مضاد الأكسدة، البلعمة.