

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 :**

BELFAR Aicha et GHERAIRI Aicha

**Activité anti-Complément des Oligosaccharides issus d'une plante spontanée  
à caractère médicamenteux de la région de Ghardaïa  
Sahara Septentrional Est Algérien**

Soutenu publiquement

**Le : 28/06/2021**

Devant le jury :

<b>Président</b>	OULD EL HADJ Mohamed Didi	Pr	Univ. Ouargla
<b>Encadreur</b>	BENAOUN Fatima	MCB	Univ. Ouargla
<b>Co-Encadreur</b>	BOUAL Zakaria	Pr	Univ. Ouargla
<b>Examineur</b>	TELLI Alia	MCB	Univ. Ouargla

**Année Universitaire : 2020/2021**

## **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.*

*Nous remercions tous du fond du cœur particulièrement notre encadreur Melle BENAOUN Fatima, 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, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa contribution générale à l'élaboration de ce travail.*

*Nous voudrions remercier Mr. BOUAL Zakaria, Professeur au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla pour son aide pour la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury :*

*Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi, 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.*

*Melle TELLI Alia, 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 d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions le Laboratoire de Protection des Écosystèmes en Zones Arides et Semi Arides, en particulier son Directeur, Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.*

*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.*

*Nous remercions le Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico Chimiques «CARAPC», en particulier son Directeur, Mr BELKHALFA Hakim de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.*

*Nos remercions s'adressent à tous les enseignants du département Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla.*

*A tous nos amis surtout les étudiantes de la promotion Master II Biochimie 2021 de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla.*

*Enfin, nous remercions tous ceux et celles, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Dédicace



*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents, sans eux je n'aurais pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études*

*A mes chères sœurs : Safia , Halima , Amina , Asma*

*A mes frères : Abd allah , Boubakar , Massoud, et les jumeaux Abd arahman , Abd alaziz*

*L'épouse de mon frère : Khadija et leur petite fille: Jana*

*A toute la famille Belfar et Sarray*

*A mes Amis: Khaoula, Sabrina, Siham, Hannane, Ahlam*

*A ma future marie et mes futures enfants*

*A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé par leur soutien moral*

*Aicha B*

# *Dédicace*



*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents, sans eux je n'aurais pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études*

*A mes chères sœurs : Nora, Merieume, fatiha ,Amina ,fatima*

*A mes frères : Bachir, Ahmed , Ali ,chabenne,*

*La petite fille: Chaima*

*A mon fiancé*

*A toute la famille Ben Ammer*

*A mes Amis: Selma, Yousra, Asma, Sabrina, Siham, Hannane, Safia, Mabrouka,*

*A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé par leur soutien moral*

*Aicha Gh*

## Table des matières

Remerciements .....	.....
Dédicace .....	.....
<b>SYMBOLES ET ABREVIATIONS .....</b>	<b>.....</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>I.- Système du complément.....</b>	<b>5</b>
<b>I.1.- Protéines du complément.....</b>	<b>6</b>
<b>I.2.- Fonctions biologiques de système du complément .....</b>	<b>6</b>
<b>I. 2.1.- Inflammation et anaphylatoxines .....</b>	<b>6</b>
<b>I. 2.2.- Opsonisation et lyse des cibles.....</b>	<b>8</b>
<b>I.3.- Voies d'activation du complément.....</b>	<b>8</b>
<b>I.3.1.- Voie classique.....</b>	<b>10</b>
<b>I.3.2.- Voie alterne .....</b>	<b>11</b>
<b>I.3.4.- Voie effectrice .....</b>	<b>14</b>
<b>I.5.- Récepteurs du complément.....</b>	<b>18</b>
<b>I.6.- Déficits en protéines du complément et pathologies.....</b>	<b>19</b>
<b>I.6.1.- Déficits de la voie classique (maladies auto immunes).....</b>	<b>19</b>
<b>I.6.2.- Déficits de la voie des lectines .....</b>	<b>19</b>
<b>I.6.3.- Déficits des inhibiteurs du complément.....</b>	<b>20</b>
<b>I.6.4.- Déficits de la voie alterne (pathologies rénales) .....</b>	<b>21</b>
<b>I.7.- Médicaments à activité anti complément .....</b>	<b>22</b>
<b>I.7.1.- L'éculizumab.....</b>	<b>22</b>
<b>I.7.2.- Le ravulizumab.....</b>	<b>23</b>
<b>II.- Activités biologiques des polysaccharides .....</b>	<b>24</b>
<b>II.1.- Activité anti-complément .....</b>	<b>24</b>
<b>II.- Matériel et méthodes .....</b>	<b>30</b>
<b>II.1.- Principe d'étude .....</b>	<b>30</b>
<b>II.2.- Matériel d'étude.....</b>	<b>31</b>
<b>II.2.1.- Solvants et réactifs .....</b>	<b>31</b>
<b>II.2.2.- Matériel biologique .....</b>	<b>36</b>
<b>II.3.- Méthodologie d'étude .....</b>	<b>36</b>
<b>II.3.1.- Activité anti complément des oligosaccharides par la technique hémolytique AP100</b>	<b>36</b>
36	
<b>III.- Activité anti complément des oligosaccharides via le test AP100 .....</b>	<b>47</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>52</b>

<b>Références et Bibliographies:</b> .....	55
<b>Annexes</b> .....	63
<b>Résumé</b> .....	64

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Tois Voies d'activation de système du complément ; classique, alterne et de lectines (Nesargikar, et al. 2012a; Sarma et Ward 2011). .....	6
<b>Figure 2</b> : Schéma d'activation et d'amplification de la voie classique de complément (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). .....	11
<b>Figure 3</b> : Schéma d'activation et d'amplification de la voie alterne du complément (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi, 2006) .....	13
<b>Figure 4</b> : Voie effectrice commune et la formation de complexe d'attaque membranaire (Daugan et al, 2017b).....	15
<b>Figure 5</b> : A ; Régulation d'activation de système du complément. B ; Récepteurs de C3 (Kulkarni et Afshar-Kharghan 2008).....	16
<b>Figure 6</b> : Maladies auto-immunes et exploration du complément (Rosain, et al. 2014a). .....	19
<b>Figure 7</b> : Exploration du complément dans le cadre d'une recherche d'un déficit immunitaire (Rosain, et al. 2014a). .....	20
<b>Figure 8</b> : Angio-oedème bradykinique et recherche d'un déficit en C1 inhibiteur (Rosain, et al. 2014a).....	21
<b>Figure 9</b> : Déficiences en protéines du Complément et pathologies (Michaël, et al. 2013; Sadallah et Schifferli 2018) .....	22
<b>Figure 10</b> : Structure moléculaire et mode d'action du éculizumab;a : Représentation schématique de la structure de l'éculizumab ;b : Structure tridimensionnelle qui présente le mécanisme d'action moléculaire de l'éculizumab ; c : Représentation schématique du mécanisme d'action moléculaire de l'éculizumab (Zuber, et al. 2012) . .....	23
<b>Figure 11</b> : Blocage ciblé de la protéine C5 du complément (Rother, et al. 2007). .....	23
<b>Figure 12</b> : Schéma de différentes étapes de préparation des boîtes AP100 .....	42
<b>Figure 13</b> : Schéma de différentes étapes de test AP100 (Zhang et al, 2015) modifié.....	43
<b>Figure 14</b> : Histogramme représente les pourcentages de l'inhibition de la lyse des hématies par le complément contenu dans le sérum humain normal en présence des oligosaccharides et en utilisant l'héparine comme contrôle positif.....	47
<b>Figure 15</b> :Test AP100 ; Inhibition de la lyse des hématies par le complément contenu dans le sérum humain normal en présence des oligosaccharides et en utilisant l'héparine comme contrôle positif. ..	48

**Liste des Tableaux :**

**Tableau1** - Les composants du complément dans les différentes voies d'activation (Carroll 2004; Gasque, et al. 1996 ; Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi 2006). ..... 7

**Tableau2** - Activateurs des trois différentes voies d'activation du complément (Singh 2015). ..... 8

**Tableau3** - Les trois activités principales du complément mises en jeu dans la défense contre les infections (Noris et Remuzzi 2013; Puissochet 2016) ..... 9

**Tableau4** - Les protéines impliquées dans la régulation de l'activité du système du complément (Puissochet 2016; Rosain, et al. 2014b)..... 17

**Tableau5** - Récepteurs des composants du complément et de leurs produits d' activation (Singh 2015). ..... 18

**Tableau6** - Activité anticompément des polysaccharides ..... 25

**Tableau7** - Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation ..... 33

**Tableau8** - Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation. .... 34

**Tableau9** - Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation ..... 35

**Tableau10** - Méthode de dilution des oligosaccharides de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae)..... 39

**Tableau11** - Position systématique et usages thérapeutiques des espèces de plantes spontanées à caractère médicinal choisies dans la région de Ghardaïa (Benaoun et al, 2017).39

**Tableau12** - Test anti complément AP100 (7 puits pour chaque boîte Pétri) ..... 44



## **ABREVIATIONS**

**MASP:** Mannan-binding serine proteases

**MASP-1:** Mannan-binding serine proteases de type 1

**MASP-2:** Mannan-binding serine proteases de type2

**MASP-3:** Mannan-binding serine proteases de type3

**MBL:** mannan-binding lectin

**CAM:** complexe d'attaque membranaire

**C1INH :** inhibiteur du C1

**C4-bp :** Protéine de liaison C4

**DAF :** Decay accelerating factor

**HRF :** Facteur de restriction homologue

**CR1 :** Récepteur 1 du complément

**IgM :** Immunoglobuline de classe M

**IgG:**Immunoglobuline de classe G

**IgE:** Immunoglobuline de classe

**LPS:** Lipo Polysaccharide

**Fc:** fraction cristallisable de l'anticorps

**CLR:** collagen –Like region

**PTX:** pentraxines

**F B:**Facteur B

**FD:** Facteur D

**AP:** Alternative pathway

**MCP:** protéine de cofacteur membranaire,

**FHL-1:** Four Et A Half LIM Domains

**CR1:** Complement receptor 1

**EDTA:** éthylène diamine-tétra acétique

**EGTA:** l'éthylène glycol-bis[-aminoéthyléther]N,N'-tétraacétique (EGTA)

**DAF:**Facteur d'accélération de décroissance

**LES:** lupus érythémateux systémique

**AO:**Les angio-œdèmes

**SHU:**Syndrome hémolytique et urémique

**GNMP:** Glomérulonéphrites membrano-prolifératives

**HPN :** L'hémoglobinurie paroxystique nocturne

**GPI :** Glycosyl phosphatidylinositol

**aHUS :** Syndrome hémolytique et urémique atypique

**Fuc :**Fucane

**Man :** Mannose

**Rha :** Rhamnose

**GlcA :**L'acide galacturonique

**Glc :**Glucose

**Gal:**Galactose

**Xyl :**Xylose

**Ara:** Arabinose

**Galp :** Galactopyranosyl

**ACP:** Alternative Complement Pathway

**PBS:** Solution saline tamponnée de phosphate

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Dihydrogénophosphate de potassium anhydre

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:**D'Hydrogénophosphate disodique anhydre Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**NaCl:** Chlorure de sodium

**KCl :**Chlorure de potassium

**TFA :**Acide tri-fluoro-acétique

**MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O :** Chlorure de magnésium hydrate

**SHN :**Sérum humain normal

# *Introduction*

## Introduction

Le complément est un élément important de l'immunité innée, son activation est essentielle à l'homéostasie du système immunitaire (Xia et al, 2020; Zheng et al, 2018).

Il présente un large éventail des fonctions ; protection contre les organismes étrangers, élimination des complexes immuns de la circulation et nettoyage des débris cellulaires (Zheng et al, 2018). Ce système est composé de plus de 30 protéines (Du et al, 2016) comprenant des pro-enzymes protéolytiques, des composants non enzymatiques, des cofacteurs, des régulateurs et des récepteurs (Seo et al, 2009). Il peut être activé trois voies ; la voie classique CP, la voie alterne AP et la voie de lectines de liaison au mannane MBL (Du et al, 2016). La voie classique est activée par des complexes immuns contenant des immunoglobulines IgM et IgG, des protéines auto-phases comme la protéine C-réactive et des virus tumoraux à acide ribonucléique ARN (Mu et al, 2016). La voie alterne est directement activée par des polysaccharides, certaines immunoglobulines, des virus, des champignons et des bactéries (Mu et al, 2016).

La voie des lectines est activée par la liaison de lectines en se liant au mannane à des ligands glucidiques à la surface des pathogènes (Garcia-Laorden and al, 2008). La cascade protéolytique permet une amplification considérable puisque chaque molécule de protéinase activée à une étape peut générer de multiples copies d'une enzyme activée plus tard dans la cascade, qui à son tour clive les composants non enzymatiques tels que C3, C4 et C5 (Kulkarni et Afshar-Kharghan, 2008).

Les plus grands fragments dérivés de C3, C4 et C5 ; c'est-à-dire C3b, C4b et C5b ; sont impliqués dans des fonctions biologiques effectrices, telles que l'opsonisation, la phagocytose et l'immunomodulation (Janeway Jr et al, 2001). Cependant, les molécules plus petites appelées anaphylatoxines, C3a, C4a et C5a (Nesargikar et al, 2012), induisent la libération des médiateurs par les mastocytes et les lymphocytes, cet effet est normalement bénéfique (Lee et al, 2003). Mais lorsque le système du complément est activé d'une manière excessive peut provoquer diverses maladies auto-immunes (Xia et al, 2019), des maladies inflammatoires (Du et al, 2016) et des infections virales, par exemple ; le syndrome de détresse respiratoire aiguë, la fièvre Ebola (Wen et al, 2017), la grippe H1N1 (Wen et al, 2020), la maladie d'Alzheimer, les lésions d'ischémie et de perfusion et le lupus érythémateux (Chen et al, 2016), la polyarthrite rhumatoïde (Shi, 2016), l'ostéoarthrite, la dermatite atopique, l'inflammation du fluide pulmonaire, les lésions athérosclérotiques et l'allergie (Lee et al, 2003).

A cet effet, l'inhibition du complément est une stratégie pour traiter ces maladies. Des différents inhibiteurs du complément ont été développés pour inhiber les différents composants de la cascade du complément, leurs effets secondaires ne peuvent être ignorés (Jin et al, 2016) .

Malgré que de nombreuses molécules synthétiques, dont le sulfate de dextran , le mésilate de nafamostat (FUT-175) et la compstatine , se sont révélées capables d'inhiber l'activation du système du complément (Jin et al, 2016), Il est aussi encourageant de rechercher des bio substances anti complément à partir de ressources naturelles comme les produits animaux, microbiens et végétaux, tels que les acides phénoliques, les protéines, les flavonoïdes, les stéroïdes et les polysaccharides (Jin et al, 2016) qui sont des modificateurs importants de la réponse biologique avec d'excellents effets thérapeutiques et ils ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine de la pharmacologie en raison de leurs diverses bio activités et leurs effets secondaires négligeables (Huo et al, 2020).

L'activité immuno modulatrice est l'une des principales activités biologiques des polysaccharides naturels (Hromádková et al, 2013; Ren et al, 2019) obtenus à partir des plantes médicinales traditionnelles qui ont été signalés comme présentant des activités anti complément *in vitro*(Chen et al, 2016; Du et al, 2016). Pour cette raison, la présente étude vise à rechercher l'activité anti-complément des oligosaccharides obtenues par hydrolyse des polysaccharides d'origine végétale isolés à partir d'une plante spontanée à caractère médicinaux du Sahara septentrional algérien *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae), appelée aussi "Inim" ; une plante à fleurs annuelle semi-aride et spontanée utilisée comme médecine traditionnelle pour le traitement de diverses blessures et maladies, par exemple les constipations, les ulcères et les inflammations (Benaoun et al, 2017)

Ce travail de recherche vise la capacité immuno modulatrice *in vitro* des oligosaccharides vis-à-vis le système du complément en exprimant l'inhibition de leur activité via la voie alterne représentée par l'inhibition de lyse des hématies où l'héparine est utilisé comme contrôle positif. A cet effet, dans le premier chapitre nous allons détailler la partie bibliographique qui montre le système du complément, les différentes voies d'activation, les maladies évoluées en cas de dysfonctionnements ou bien en cas de déficits en composant de ce système, les médicaments qui ont une activité anti-complément et a la fin certain polysaccharides a activité anti complément.

Le second chapitre, aborde l'une des techniques d'exploration de l'activité anti complément *in vitro* par le test hémolytique AP100 qui consiste à déterminer la concentration inhibitrice des oligosaccharide capable d'inhiber 100% de lyse la des hématies par le sérum humain normale ( $AP_{100}$ ). Le troisième chapitre présente les principaux résultats obtenus, suivi

de discussions et des interprétations. Une conclusion générale et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achevant ce travail.

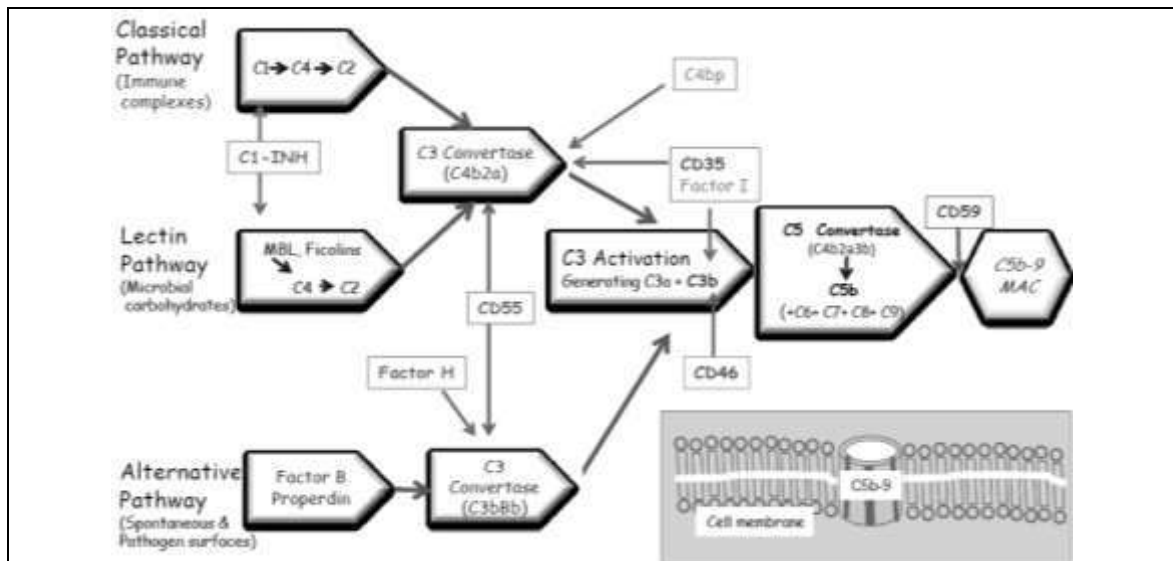
*Chapitre I :*  
*Synthèse Bibliographique*

## I.- Système du complément

A la fin des années 1890, le système du complément a été identifié pour la première fois comme un composant thermolabile du sérum avec des propriétés antimicrobiennes, capable de compléter l'action des anticorps (Daugan, et al. 2017b). Il intervient dans la destruction des agents infectieux, l'élimination des complexes immuns, le contrôle des réponses inflammatoires et la modulation des réponses immunes spécifiques (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi 2006). Les connaissances ont évolué et le complément est considéré comme une partie intégrante du système immunitaire inné qui sert à relier l'immunité innée et l'immunité adaptative par la reconnaissance des virus, la neutralisation virale, le recrutement et la stimulation des leucocytes aux sites d'infection, l'opsonisation et l'activation des lymphocytes T et B (Gupta et Tripathy 2020). Il comprend un groupe de plus de 30 protéines sériques (North et Whaley 2001 ; Carroll 2004) subdivisées en protéines membranaires de régulation et des récepteurs cellulaires pour certains composants ou leurs fragments d'activation (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi 2006). Ces composants sont disponibles sous forme soluble, appelée phase fluide, ou bien exprimée sur la membrane cellulaire, la phase solide (Angioi, et al. 2016). Les protéines du complément sont synthétisées principalement par le foie qui fournit 90% des composants plasmatiques, à l'exception du C1q et des facteurs D et P, qui ne sont pas synthétisés par l'hépatocyte (Gasque, et al. 1996). Les trois voies d'activation du système de complément ; classique, de lectines et alternative commencent par l'activation du composant central C3 comme étape commune, mais elles diffèrent de la nature de reconnaissance (Carroll 2004; Gupta et Tripathy 2020). La première étudiée est la voie classique (Carroll 2004), elle est activée par la liaison du C1q au complexe anticorps-antigène à la surface de l'agent pathogène (Carroll 2004), la voie des lectines est activée par fixation des motifs glucidiques sur l'agent pathogène des sérines protéases comme les Mannan-binding serine protéases (MASP) associées à la mannan-binding lectin (MBL) et les ficolines (Gupta et Tripathy 2020) et l'activation de la voie alternative se fait spontanément par l'attachement du C3b à une surface particulière (Kulkarni et Afshar-Kharghan 2008). Ces trois voies d'activation du complément aboutissent à la formation d'une C3 convertase (classique ou alterne) qui est responsable au clivage du C3 en deux fragments, le C3a ; anaphylatoxine et le C3b ; opsonine puissante (Daugan, et al. 2017b). La liaison de plusieurs molécules C3b aux cellules et autres débris les marque pour la phagocytose par les macrophages. La propagation de l'activation du complément par la C3 convertase entraîne la génération d'une C5 convertase à la surface des cellules (Kulkarni et Afshar-Kharghan 2008) qui sert à cliver le C5 en C5a ; anaphylatoxine beaucoup plus puissant que le C3a et C5b. Les anaphylatoxines, C3a et C5a sont capables de recruter des neutrophiles dans les zones d'inflammation et de lésion (Kulkarni et Afshar-Kharghan 2008). Le rôle du fragment C5b est d'initier l'assemblage de la voie terminale du complément qui conduit à la formation du



complexe d'attaque membranaire (CAM, C5b-9) et permet de lyser les pathogènes (Daugan, et al. 2017b).



**Figure 1 :** Tois Voies d'activation de système du complément ; classique, alterne et de lectines (Nesargikar, et al. 2012a; Sarma et Ward 2011).

## I.1.- Protéines du complément

Le système du complément est constituée de plus de 30 protéines (Carroll 2004) d'origine hépatique à l'exception du C1q et des facteurs D et P (Gasque, et al. 1996). Ces protéines sont subdivisées on protéines membranaires de régulation et des récepteurs cellulaires (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi 2006) ; voire tableau N°1.

## I.2.- Fonctions biologiques de système du complément

### 1.2.1.- Inflammation et anaphylatoxines

L'activation de système du complément entraîne le clivage de ses protéines en fragments biologiquement actifs favorisant le recrutement et la chimiotactisme (Frémeaux-Bacchi, et al. 2012), et les anaphylatoxines C3a et C5a activent des cellules inflammatoires au site de l'infection par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G, C3aR et C5aR (Angioi, et al. 2016).

**Tableau 1-** Les composants du complément dans les différentes voies d'activation (Carroll 2004; Gasque, et al. 1996 ; Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi 2006).

Voie d'activation	Composant C	Composant C activé	Régulateur C	Déclencheur/ Initiateur C
<b>Voie classique</b>	C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, (C6, C7, C8, C9)	C1r, C1s, C2a, C3b, C4b, C5b	C1INH, C4-bp, FI, CR1, DAF, MCP (CD46)	C1q
<b>Voie alterne</b>	C3H <sub>2</sub> O, FB, FD, P, C5, (C6, C7, C8, C9)	C3b, Bb	FI, FH, CR1, DAF, MCP(CD46)	C3H <sub>2</sub> O
<b>Voie de lectines</b>	MBL, Ficolins, MASP-1, MASP2, C4, C2, C5, (C6, C7, C8, C9)	MASP-1, MASP-2, C4b, C2a, C5b	C1INH, C4-bp, FI, FH, CR1, DAF, MCP (CD46)	MBL/ ficolins
<b>Terminal commun lytique</b>	C5b, C6, C7, C8, C9	C5b	Protein S (vitronectine) clusterine, protectine (CD59), HRF	C5b

- i. **C1INH** : inhibiteur du C1 ;
- ii. **C4-bp** : Protéine de liaison C4 ;
- iii. **MBL** : Mannose/ mannan binding lectin;
- iv. **MASP** : MBL-associated serine protease ;
- v. **DAF** : Decay accelerating factor ;
- vi. **MCP** : Membrane cofactor protein;
- vii. **HRF** : Facteur de restriction homologue ;
- viii. **CR1** : Récepteur 1 du complément.

### 1.2.2.- Opsonisation et lyse des cibles

L'opsonisation par C3b des agents pathogènes ou d'autres molécules cibles pour une éventuelle destruction et lyse directe des pathogènes par le complexe d'attaque membranaire ou complexe lytique celui-ci naît du clivage de C5 par les C3 convertases dans les deux voies alterne ou classique en C5a et en C5b (Frémeaux-Bacchi, et al. 2012). La liaison séquentielle de C5b avec C6, C7, C8 et enfin C9 aboutit à l'assemblage du complexe C5b-9 ou complexe d'attaque de la membrane très stable (Angioi, et al. 2016). La polymérisation de C9 induit l'insertion dans les membranes cellulaires et la formation des pores entraînant la lyse des cellules cibles (Frémeaux-Bacchi, et al. 2012) ; le tableau N°2.

### I.3.- Voies d'activation du complément.

Le système du complément peut être stimulé par certains activateurs qui sont indiqués dans le tableau N°2.

**Tableau 2-** Activateurs des trois différentes voies d'activation du complément (Singh 2015).

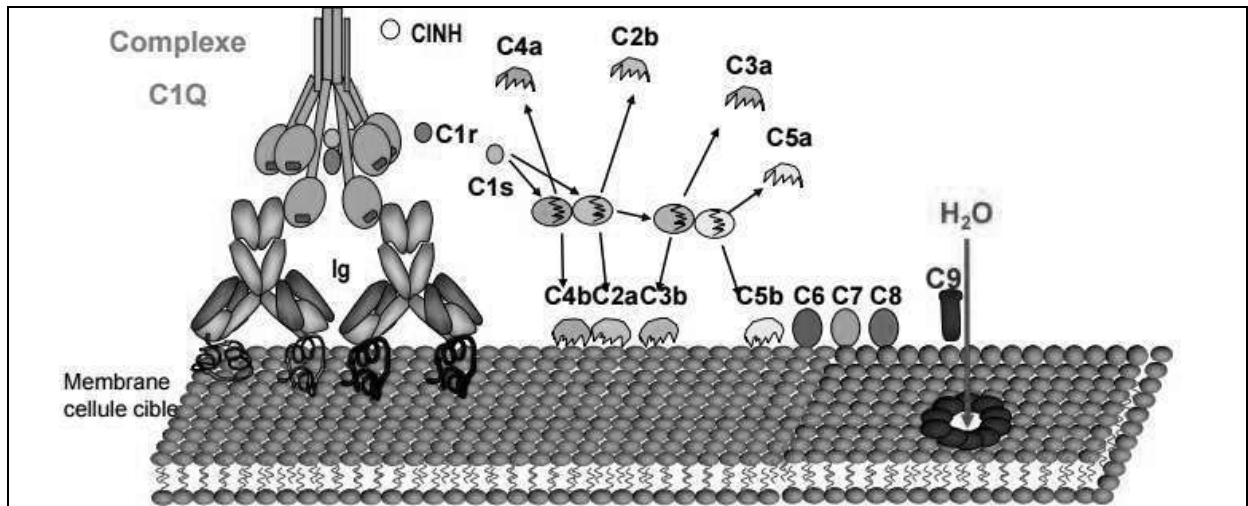
Voies d'activation		
Voie classique	Voie alterne	Voie de lectine
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Complexe immun IgM et IgG</li> <li>▪ Pentraxines</li> <li>▪ Acide nucléique</li> <li>▪ Mitochondrie</li> <li>▪ LPS</li> <li>▪ Polysaccharide de capsule bactérienne</li> <li>▪ Protéine c-réactive liée au polysaccharide Pneumococcique de type c*</li> <li>▪ Composants microbiennes</li> <li>▪ Cellules apoptiques</li> <li>▪ Protéine <math>\beta</math>-amyloïde sérique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bactéries</li> <li>▪ Champignons et les levures</li> <li>▪ Certain virus</li> <li>▪ Parasites</li> <li>▪ Certain cellules tumorales</li> <li>▪ Erythrocytes hétérologues LPS</li> <li>▪ Acide teichoïque</li> <li>▪ Zymosane</li> <li>▪ Facteur de venin de cobra</li> <li>▪ Polymères anioniques</li> <li>▪ Agarose</li> <li>▪ Complexe immun IgG, IgA, et IgE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Polysaccharides contenant du mannose et de N-acétylglucosamine sur les bactéries, virus et les levures .</li> <li>▪ Variantes de glycosylation des IgG</li> </ul>

**Tableau 3-** Les trois activités principales du complément mises en jeu dans la défense contre les infections (Noris et Remuzzi 2013; Puissochet 2016)

Activité	Composants du complément impliqué
<b>Défense innée contre les infections</b>	
Lyse des membranes des bactéries et des Cellules	Complexe d'attaque membranaire
Opsonisation	C4b et C3b
Induction de l'inflammation et chimiotactismes des anaphylatoxines	C3a, C4a, C5a et leurs récepteurs leucocytaires
<b>interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative</b>	
Augmentation de la réponse anticorps	C3b, C4b et leurs fragments protéolytiques fixés sur les complexes immuns et les antigènes, les récepteurs de C3 sur les cellules immunitaires
Augmentation de la mémoire immunitaire	C3b, C4b et leurs fragments protéolytiques fixés sur les complexes immuns et les antigènes, les récepteur pour les composants du complément à la surface des cellules dendritiques
Augmentation de la présentation Antigénique	MBL, C1q, C3b, C4b et C5a
Effets potentiels sur les lymphocytes T	C3, C3a, C3b, C5a
Augmentation de la réponse anticorps	C3b, C4b et leurs fragments protéolytiques fixés sur les complexes immuns et les antigènes, les récepteurs de C3 sur les cellules immunitaires
<b>Phase de contraction de la réponse immunitaire</b>	
Élimination des complexes immuns des tissus	C1, C2, C4, fragments de C3 et C4
Élimination des cellules apoptotiques	C1q, fragment de C3 et C4
Induction des lymphocytes T régulateurs	CD46

### I.3.1.- Voie classique

La voie classique CP est initiée lorsque des complexes immunes sont formés après la liaison d'IgG ou d'IgM à des agents pathogènes ou à d'autres antigènes étrangers et non-soi. Le complexe C1, un complexe multimérique composé de molécules C1q, C1r et C1s se lie à la partie Fc de IgG ou IgM du complexe immune (Sarma, 2011). Il est établi depuis longtemps que le C1q a besoin d'une IgM liée à la surface ou de plusieurs molécules d'IgG à proximité immédiate afin d'interagir avec plusieurs de ses domaines globulaires et d'activer le complément (Merle, et al. 2015). L'IgM est une molécule polymère plane dans laquelle les sites de liaison au C1q sont cachés, un changement de conformation se produit lors de la liaison à un antigène, conduisant à l'exposition des sites de liaison au C1q. Contrairement à l'IgM, l'IgG est un monomère, malgré la présence des sites de liaison au C1q, il présente une très faible affinité de liaison (Merle, et al. 2015). Le C1q possède 6 sites de liaison qui s'associent à la fragment constant d'immunoglobuline (Fc) des IgM ou des IgG (Angioi, et al. 2016). Les protéases à sérine C1r et C1s sont ensuite activées par liaison au complexe C1q-immunoglobuline (Angioi, et al. 2016). Une fois que le C1q se lie à sa surface cible, un changement de conformation est nécessaire pour transmettre le signal du domaine gC1q via le CLR pour induire l'auto-activation du C1r (Merle, et al. 2015). Par la suite, le C1r activé va cliver et activer le C1s, ce dernier active à son tour les protéases à sérine qui conduisent au clivage de C4 et C2 (Nesargikar, et al. 2012b). C4 en C4a et C4b, et C2 en C2a et C2b (Angioi, et al. 2016). Le fragment C4b se combine avec la bicouche lipidique de la cellule cible et la C2a forme la C3 convertase de la voie classique, C4b2a (Angioi, et al. 2016). En outre, les pentraxines (PTX) peuvent reconnaître les agents pathogènes et les éliminer en se liant directement au C1q, qui clive à son tour le C3 en C3a et C3b (Sarma et Ward 2011). Alors que le C3a agit comme un recruteur de cellules inflammatoires (Nesargikar, et al. 2012b). L'anaphylatoxine C3b se lie au complexe C4b2a pour former la C5 convertase C4b2a3b. La C5 convertase initie la formation du complexe d'attaque de la membrane (MAC), qui va créer des pores fonctionnels dans les membranes bactérienne, ce qui conduit à sa lyse (Nesargikar, et al. 2012b). La voie classique peut également être activée par d'autres signaux comme la protéine C-reactive, protéines virales, les polyanions, les cellules apoptotiques et l'amyloïde, ce qui prouve que la voie classique pourrait être activée indépendamment des anticorps (Nesargikar, et al. 2012b).



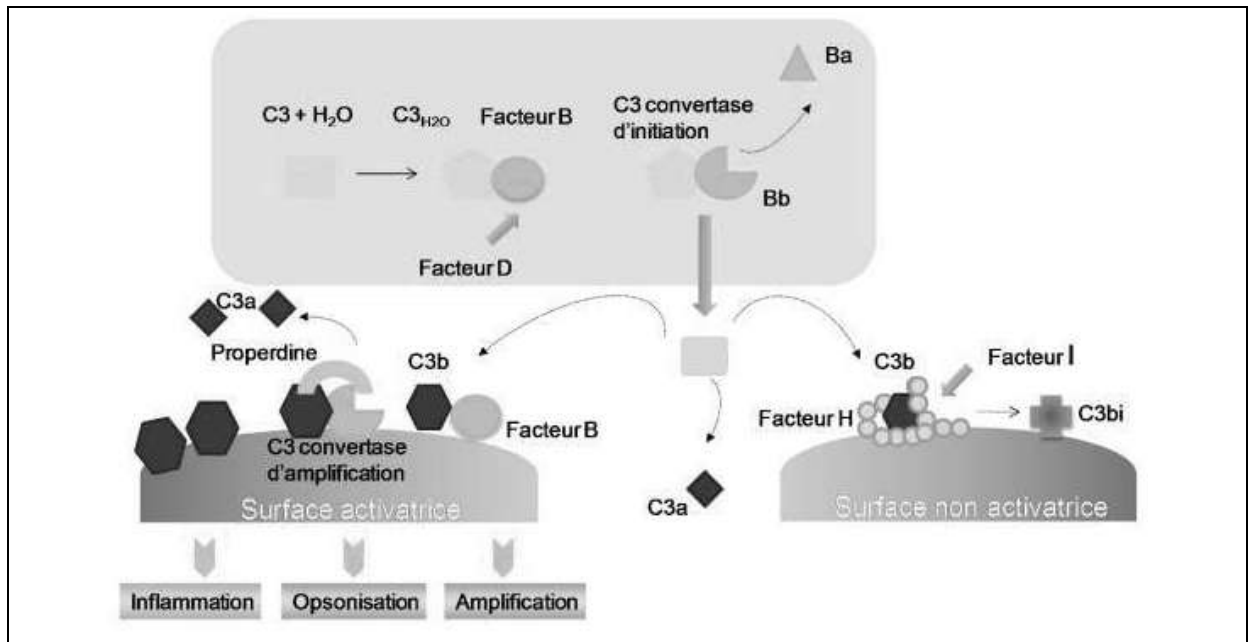
**Figure 2 :** Schéma d'activation et d'amplification de la voie classique de complément (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi, 2006).

### I.3.2.- Voie alterne

La voie alterne est la forme la plus ancienne de la phylogénie. Elle est considérée comme un système de surveillance qui fonctionne spontanément en permanence et constitue la première ou la très précoce ligne contre les microbes envahisseurs (Abuaf, et al. 2018; Zipfel, et al. 2007). Cette partie du système de défense immunitaire inné est immédiatement activée, en moins d'une seconde, dès qu'un microbe est en contact avec l'organisme (Zipfel, et al. 2007). Elle fournit une voie rapide et indépendante des anticorps (Morgan 2000). Cette voie peut être activée par des substances activatrices d'origine bactérienne telles que le Lipo PolySaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives, des bactéries Gram positives, des virus ou des cellules infectées ou transformées (Abuaf, et al. 2018; Puissochet 2016). La voie alterne surveille l'invasion des pathogènes en maintenant un faible niveau d'activation constitutive par un processus connu sous le nom de " tick-over " (Merle, et al. 2015), qui est la première manière d'initier cette voie (Puissochet 2016). Le tick-over est l'hydrolyse spontanée d'une liaison thioester labile, qui convertit le C3 en une forme bioactive C3(H<sub>2</sub>O) dans la phase fluide (Merle, et al. 2015). Le C3 est le composant clé de la voie alterne, mais trois autres protéines, le facteur B (fB), le facteur D (fD) et la properdine, sont également nécessaires (Morgan 2000). L'activation de la voie alterne du complément se déroule en deux étapes. La phase d'initiation est initiée par l'activation spontanée du C3 qui subit à un changement de conformation en exposant ainsi son thioester réactif (Zipfel, et al. 2007). L'étape suivante est cependant discriminatoire. Le C3b lié à la surface est pertinent. L'activation comprend la formation d'une convertase C3bBb (Zipfel, et al. 2007). Le clivage de C3 entre Arg726 et Ser727 par la convertase de la voie alternative, aboutit à la génération de C3a un petit peptide anaphylactique (9 kDa), et de l'acide sulfurique. et un gros fragment C3b (185kDa) qui reste attaché de manière covalente aux surfaces (Zipfel, et al. 2007). Le C3b subit un changement structurel à l'exposition de nouveaux sites de liaison et cela permet

le recrutement de FB (Merle, et al. 2015). Le FB, une protéine plasmatique à chaîne unique de 93 kDa, étroitement liée à C2, se lie à C3b d'une manière dépendante de  $Mg^{2+}$ . La liaison rend FB susceptible d'être clivée par FD, une sérine protéase de 26 kDa présente dans le plasma sous sa forme active, qui clive la FB en un seul site, exposant ainsi un domaine sérine protéase sur le grand fragment (60 kDa), Bb (Morgan 2000). Ce fragment formé avec C3b la convertase de voie alterne appelée C3bH2OBb en phase fluide (Zipfel, et al. 2007; Merle, et al. 2015). La properdine se lie et stabilise le complexe C3bBb, ce qui multiplie par trois ou quatre fois la durée de vie de la convertase active, la convertase active stable convertit le C3 et génère le C3b, et l'anaphylatoxine C3a (Zipfel, et al. 2007). C3b peut se lier de manière covalente à des composants viraux pour faciliter l'opsonisation et la phagocytose (Gupta and Tripathy 2020). Cette activation se produit dans la phase fluide et l'enzyme active génère des molécules de C3b supplémentaires et multiples qui peuvent se déposer sur n'importe quelle surface et former un amas (Zipfel, et al. 2007), le C3b lié agit comme un récepteur essentiel pour le C5, permettant le clivage du C5 par Bb dans un complexe C3bBb adjacent et la libération de C5b et de peptide anaphylactique C5. La convertase AP C5 comprend deux molécules de C3b, l'une liant Bb dans le complexe C3bBb et l'autre agissant comme récepteur du C5 (Morgan 2000). Le fragment restant est la molécule C5b. C5b peut s'associer aux membranes artificielles, aux cellules nécrotiques et à certains agents pathogènes (Puissochet 2016). Le dernier moyen d'initiation est l'activation par des protéases. Certaines protéines de coagulation peuvent activer ou stabiliser certains composants de la voie alternative (Puissochet 2016). La poursuite de l'activation est contrôlée par des régulateurs tels que les régulateurs de la phase liquide comme le facteur H et le FHL-1 (Zipfel, et al. 2007), ainsi que par des régulateurs liés à la membrane, comme la protéine (MCP/CD46), le facteur d'accélération de la désintégration (CD55), le récepteur 1 du complément (CR1/CD35) et la protectine (CD59), qui tous inhibent la progression de l'activation et ou arrêtent la cascade (Morgan et Harris, 1999).

La voie alterne nécessite des ions  $Mg^{2+}$  pour l'assemblage du complexe C3bBb, tandis que la voie classique nécessite à la fois des ions  $Mg^{2+}$  pour l'assemblage du complexe C4b2a et des ions  $Ca^{2+}$  pour l'assemblage du complexe C1. Ceci fournit un moyen très utile de distinguer les deux voies dans les échantillons de sérum. L'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA), en chélatant les deux ions, bloque les deux voies, tandis que l'éthylène glycol-bis[-aminoéthyléther]N,N'-tétraacétique (EGTA) avec supplément de  $Mg^{2+}$  ne chélate que le  $Ca^{2+}$  et bloque spécifiquement la voie classique (Morgan 2000).



**Figure 3** : Schéma d'activation et d'amplification de la voie alterne du complément (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi, 2006)

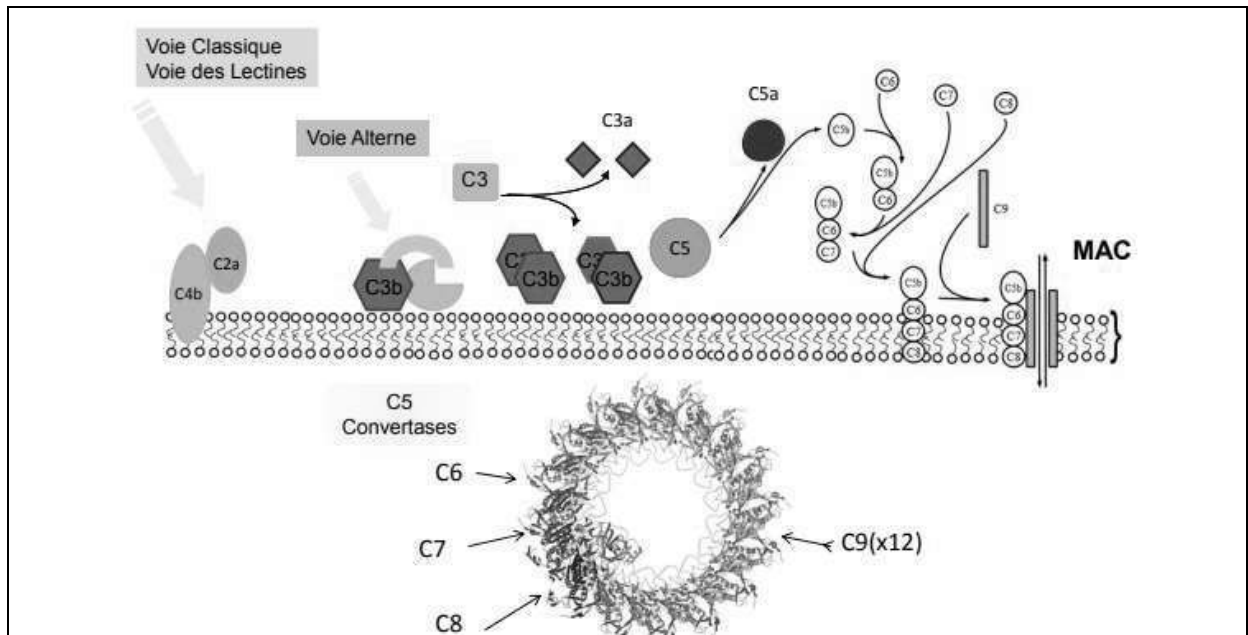
### I.3.3.- Voie des lectines (MBL )

MBL; également appelée mannose-binding lectin est une lectine  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante (Selander, et al. 2006), a besoin des ions de calcium pour se transformer et se lier aux glucides (North et Whaley 2001), appartenant à la famille des collectines et est un constituant important de l'immunité innée (Selander, et al. 2006). Cette voie est activée par la fixation d'un complexe MBL-MASP qui est constitué de l'association de lectines, comme la MBL (mannan-binding lectin) ou ficolines avec des sérine estérases, les MASP (MBL-associated serine protéases) (Daugan, et al. 2017b) sur les hydrates de carbone des micro-organismes (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi 2006). MBL c'est une protéine qui ressemble structurellement à la C1q reconnaît sélectivement des motifs de sucres tels que le mannose, la N-acétylglucosamine et le fucose sur les surfaces microbiennes (Selander, et al. 2006). La MBL circule sous la forme d'un complexe macromoléculaire (North et Whaley 2001) en association avec 3 protéases, la sérine protéase 1 associée à la MBL (MASP-1 MASP-2 et MASP-3 et la protéine non enzymatique MAp19 (Selander, et al. 2006) les oligomères de la MBL d'ordre inférieur s'associent principalement à la MASP-1 et à la MAp19, tandis que les oligomères d'ordre supérieur s'associent à la MASP-2 et à la MASP-3. La L-ficoline et la H-ficoline sont 2 autres protéines de reconnaissance qui forment des complexes avec les MASPs (Selander, et al. 2006) une fois activées, ont la capacité de cliver les protéines C2 et C4 et participent à la formation de la C3 convertase classique (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi 2006). L'activation de la cascade suit alors le même cheminement que celui observé dans la voie classique (Frémeaux-Bacchi, et al. 2012).



### I.3.4.- Voie effectrice

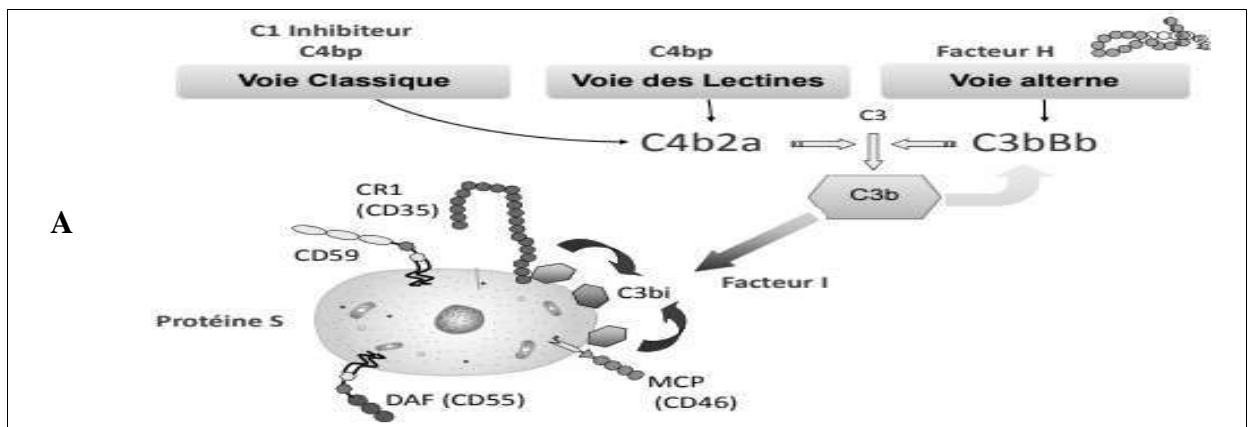
Les trois voies d'activation du complément conduisent à la formation de la C3 convertase (classique ou alterne), responsable du clivage de C3 en deux fragments, C3a et C3b suivie de la C5 convertase, qui clive la protéine C5 en deux fragments (Daugan et al, 2017a) le C5a (une anaphylatoxine) et le C5b qui s'ancre dans la membrane cible et sert de site de fixation pour tous les composants suivants de la cascade (Puissochet, 2016). Tout d'abord, une molécule de C5b se lie à une molécule de C6, et le complexe C5b,6 se lie ensuite à une molécule de C7. Cette réaction entraîne un changement de conformation des molécules constitutives, avec l'exposition d'un site hydrophobe sur C7, qui s'insère dans la bicouche lipidique. Des sites hydrophobes similaires sont exposés sur les composants ultérieurs C8 et C9 lorsqu'ils sont liés au complexe, permettant à ces protéines de s'insérer également dans la bicouche lipidique. C8 est un complexe de deux protéines, C8 $\beta$  et C8 $\alpha$ - $\gamma$ . La protéine C8 $\beta$  se lie à C5b, et la liaison de C8 $\beta$  au complexe C5b,6,7 associé à la membrane permet au domaine hydrophobe de C8 $\alpha$ - $\gamma$  qui s'insère dans la bicouche lipidique. Enfin, C8 $\alpha$ - $\gamma$  induit la polymérisation de 10 à 16 molécules de C9 en une structure multimoléculaire (Janeway Jr et al, 2001) qui s'insère dans la membrane en créant un pore fonctionnel conduisant à la lyse cellulaire (Nesargikar et al, 2012) appelée complexe d'attaque membranaire (Janeway Jr et al, 2001) induit un passage de liquide extra-cellulaire aboutissant à la lyse osmotique du microorganisme cible (Puissochet et al, 2016) Le CAM peut provoquer la lyse de certaines cellules (par exemple, les érythrocytes) en un seul coup, mais certaines cellules nucléées nécessitent plusieurs coups, ou plutôt, la formation de plusieurs canaux pour provoquer la lyse cellulaire. Toutefois, des études ont montré que lorsque le nombre de canaux assemblés sur les cellules est limité, la C5b-9 sublytique peut activer des facteurs de transcription et la transduction du signal, ce qui entraîne l'inhibition de l'apoptose et de l'homéostasie cellulaire (Nesargikar et al, 2012).

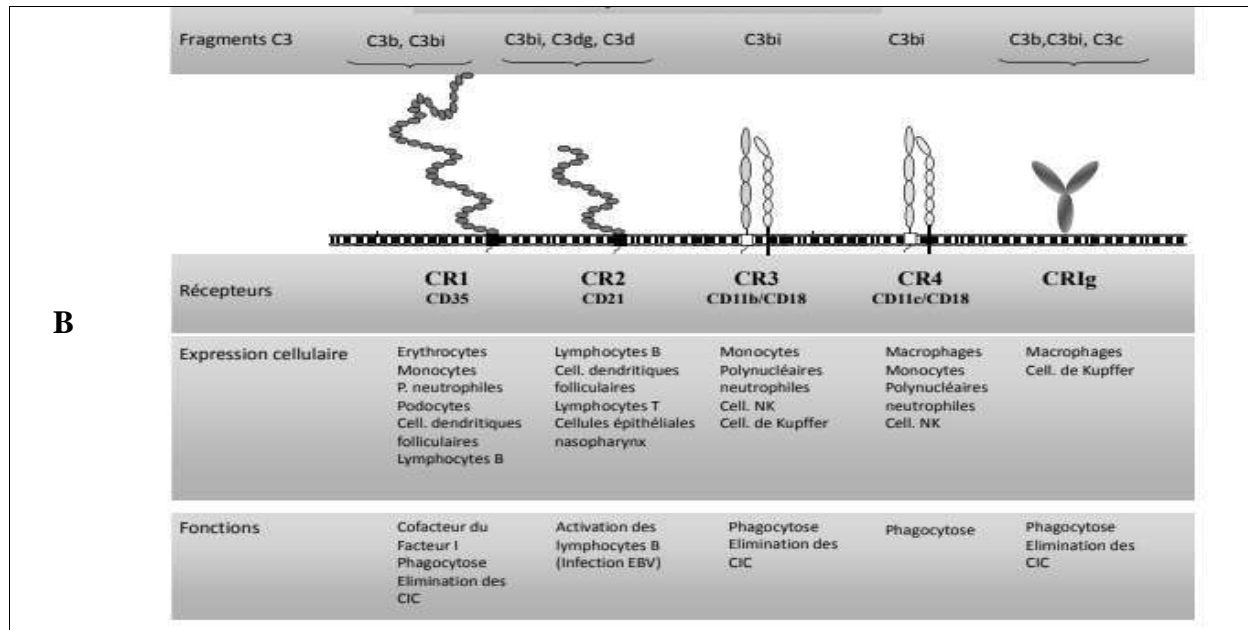


**Figure 4 :** Voie effectrice commune et la formation de complexe d'attaque membranaire (Daugan et al, 2017b).

### I.4.- Régulation de système du complément

Le système du complément capable de causer des dommages cellulaires , il est largement régulé, à la fois en phase fluide et à la surface des cellules (Kulkarni et Afshar-Kharghan 2008). La régulation se fait en trois niveaux ; (i)Inhibition de l'activité de la protéase impliquée dans la cascade d'activation du complément, (ii) Dégradation de ces protéases et (iii) Contrôle de la formation du complexe d'attaque membrane (Daugan, et al. 2017a).





**Figure 4 :** A ; Régulation d'activation de système du complément. B ; Récepteurs de C3 (Kulkarni et Afshar-Kharghan 2008).

#### I.4.1.- Mécanismes généraux et passifs

Ces mécanismes fonctionnent de façon permanente. Le premier est dû à une instabilité des produits du complément, qui peuvent être stabilisés dans certaines conditions par un mécanisme de régulation positif (par exemple la C3-convertase alterne stabilisée par la properdine) (Puissochet 2016). Ces produits, parfois formés spontanément, sont assez rapidement dégradés. De plus, les cellules de l'hôte incorporent des protéases circulantes dans leur membrane plasmique qui dégradent le C3b, ces protéases se fixant beaucoup moins à la surface des pathogènes. Ainsi les protéines du système du complément sont instables, et celles qui se fixeraient sur les cellules de l'hôte seraient rapidement dégradées (Puissochet 2016).

#### I.4.2.- Mécanismes spécifiques et actifs

Ils se composent d'inhibiteurs spécifiques qui reconnaissent avec une forte affinité les protéines et les sous produits du système du complément et les dégradent (Puissochet 2016). Les régulateurs impliqués dans le système du complément peuvent être solubles, comme le facteur inhibiteur C1 Facteurs I et H, ou membranaires, telles que CD35 (ou complément) Récepteur 1, CR1), CD46 (ou protéine de cofacteur membranaire, MCP), CD55 (Facteur d'accélération de décroissance DAF) et CD59 (Daugan, et al. 2017a); les différentes protéines de régulation sont indiquées dans le tableau N°4.

**Tableau 4-** Les protéines impliquées dans la régulation de l'activité du système du complément (Puissochet 2016; Rosain, et al. 2014b).

Protéines	Phase	Voie d'activation	Fonction
<b>C1-inhibiteur</b>	Sérique	Classique, des lectines	*Inhibition des sérines estérases C1r, C1s et MASP2 *inhibiteur de sérine protéase. *Régulation au niveau de la coagulation du facteur XIIIa et de la kallikréine, qui contrôlent la *production de bradykinines vasodilatatrices 121
<b>DAF decayaccelerating factor (CD55)</b>	Membranaire avec ancrage GPI	Classique, alterne et des lectines	*Régulation l'activité des C3 et C5 convertases *Accélère la dissociation des C3 convertases classique et alterne
<b>CR1</b>	Membranaire	Classique, alterne et des lectines	*Prévient la formation et accélère la dissociation des C3 convertases classique et alterne. *Co-facteur du facteur I
<b>C4BP</b>	Sérique	Classique, alterne et des lectines	*Régulation de l'activité de la C3 convertase classique, *Prévient la formation et accélère la dissociation de la C3 convertase classique. *Co-facteur du facteur I pour la dégradation de C4b.
<b>Facteur H</b>	Sérique	Alterne	*Inhibition de la formation de la C3 convertase alterne par liaison du C3b *Co-facteur du facteur I pour la dégradation de C4b.
<b>Facteur I</b>	Sérique	Classique, alterne et des lectines	*Sérine protéase, clive C4b et C3b à l'aide des co-facteurs CD46, CR1, Facteur H, C4BP. *Inactivation du C3b et du C4b
<b>CD46(MCP, membrane cofactor protein)</b>	Membranaire	Classique, alterne et des lectines	*Co-facteur du facteur I pour la dégradation de C4b et C3b.
<b>Protéine S ou vitronectine</b>	Sérique	Classique, alterne et des lectines	*Se lie au complexe C5b-C6-C7 soluble et prévient l'insertion dans la membrane cellulaire de l'hôte
<b>Protectine</b>	Membranaire	Classique, alterne et des lectines	*Se lie au complexe C5b-C6-C7-C8 sur les cellules de l'hôte, bloquant la fixation de C9 et la formation du complexe d'attaque membranaire.
<b>Carbopeptidase N,B et R</b>	Sérique	Anaphylatoxines issues de toutes les voies	*Clive et inactive les anaphylatoxines C3a et C5a
<b>CD59</b>	Membranaire avec ancrage GPI	Classique, alterne et des lectines	*Régulation la voie finale commune en empêchant la liaison du complexe C5b8 à la membrane cellulaire

## I.5.- Récepteurs du complément

Les récepteurs des différents composants du complément et des produits d'activation sont présentés dans le tableau N°5.

**Tableau 5-** Récepteurs des composants du complément et de leurs produits d'activation (Singh 2015).

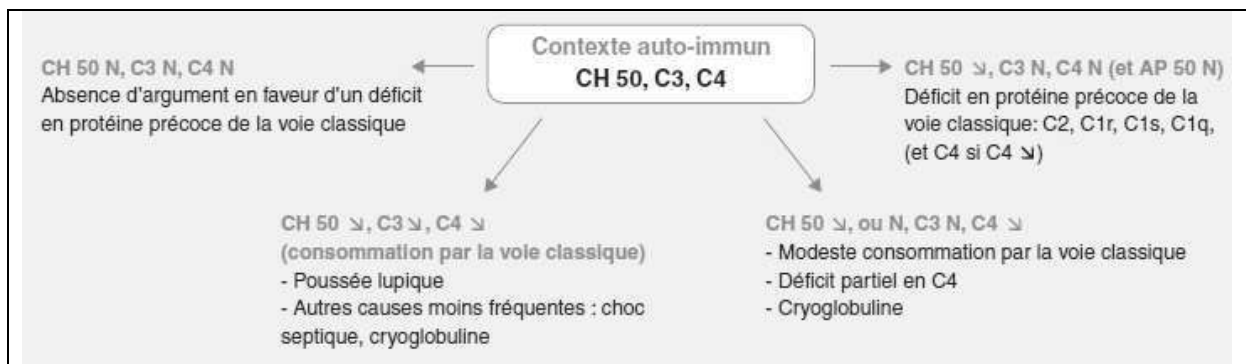
Récepteur C (CR)	Exprimé sur	Nature	Ligand Composant C/ produit d'activation
<b>CR1 (CD35)</b>	Érythrocytes, granulocytes, cellules B, lymphocytes T, FDC, podocytes glomérulaires.	Glycoprotéine membranaire poly-morphe de 160-280 kDa	C3b, C4b, iC3b
<b>CR2 (CD21)</b>	Cellules B, thymocytes, FDCs, cellules épithéliales	Glycoprotéine de 140 kDa	iC3b, C3dg, C3d, C3b
<b>CR3 (CD11b/ CD18)</b>	Monocytes, neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes, macrophages tissulaires, érythrocytes, cellules NK	Hétérodimère d'une chaîne $\alpha$ (165 kDa) et d'une chaîne $\beta$ (95 kDa) associées de manière non covalente.	iC3b, C3dg, C3d
<b>CR4 (CD11c/ CD18)</b>	Neutrophiles, monocytes, éosinophiles, lymphocytes B et Tc activés, macrophages tissulaires, cellules NK.	Hétérodimère de chaîne $\alpha$ (150 kDa) et de chaîne $\beta$ (95 kDa) associées de manière non covalente.	iC3b, C3dg
<b>CR5</b>	Neutrophiles, plaquettes	Protéine de 95 kDa	C3d, C3dg dimère
<b>C1qRp</b>	Monocytes, neutrophiles, lymphocytes, plaquettes	Glycoprotéine de 126 kDa	Fragment de collagène C1q
<b>gC1Qr</b>	Plaquettes, cellules endothéliales, éosinophiles	Glycoprotéine de 33 kDa	Tête globulaire de C1q
<b>cC1Qr</b>	Cellules Raji	Glycoprotéine de 60 kDa	Queue collagène C1q
<b>C3a/4aR</b>	Basophiles, mastocytes, éosinophiles, cellules musculaires lisses, cellules B	Protéine de 57 kDa	C3a, C4a
<b>C5aR (CD88)</b>	Basophiles, mastocytes, éosinophiles, neutrophiles, cellules musculaires lisses, cellules T, hépatocytes, cellules endothéliales	Oligomères de glycolprotéine de 47 kDa	C5a, C5a des Arg
<b>FHR</b>	Cellules B, monocytes, neutrophiles	Protéine de 170 kDa	FH

## I.6.- Déficits en protéines du complément et pathologies

Les quatre grands types de pathologies causés par les déficits en protéines du complément sont ; les pathologies autoimmunes, les pathologies rénales, les infections et les angio-oedèmes

### I.6.1.- Déficits de la voie classique (maladies auto immunes)

Les déficits en protéines précoces de la voie classique du complément, héréditaires ou acquis, sont associés à des maladies à dépôts de complexes immuns (Puissochet 2016). Les déficits complets en protéines de la phase précoce de la voie classique (C1q, C1r, C1s, C4, C2) sont associés à une prédisposition au lupus érythémateux systémique (LES) et maladies apparentées. Quarante-vingt-dix pour cent des patients diagnostiqués avec un déficit complet en C1q présentent ce type de pathologie, ce qui en fait le facteur de susceptibilité à la maladie lupique le plus élevé (Schejbel, et al. 2011). Les patients souffrant par cette maladie d'un lupus érythémateux systémique ou d'une maladie proche, d'une cryoglobulinémie, de la présence d'une immunoglobuline mono ou polyclonale autoréactive ; arthrite rhumatoïde, anémie hémolytique autoimmune ; ont tous des évidences d'une activation non contrôlée du complément (Truedsson, et al. 2007; Sadallah et Schifferli 2018).

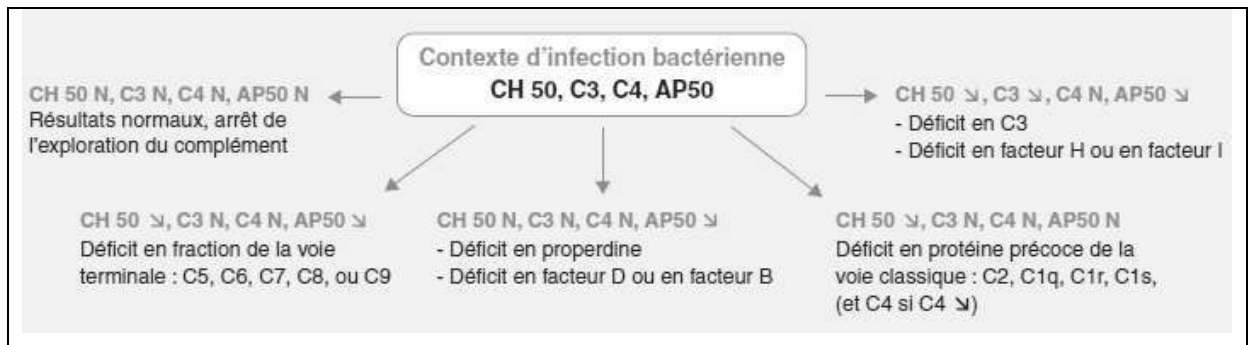


**Figure 5 :** Maladies auto-immunes et exploration du complément (Rosain, et al. 2014a).

### I.6.2.- Déficits de la voie des lectines

Les déficits de la voie des lectines, en particulier des MBLs, occasionnent également une fréquence augmentée de Lupus érythémateux disséminé. Outre cela, les déficits de cette voie voient une augmentation de la fréquence des infections en particulier chez les nourrissons et les enfants (Eisen 2010; Garcia-Laorden, et al. 2008; Heitzeneder, et al. 2012), cette infection est due à des germes encapsulés, en particulier à *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus sp* (Jönsson, et al. 2005). Les infections récidivantes ORL étaient majoritairement observées chez les nourrissons et chez l'enfant (Rosain, et al. 2014a ; Heitzeneder, et al. 2012). Les vaccins contre le pneumocoque, le méningocoque et l'haemophilus influenzae sont essentiels pour prévenir ces

infections. Une personne sur dix environ n'a qu'une quantité négligeable de MBL. Il existe en effet un polymorphisme du gène du MBL, dont l'une des formes est responsable de ce taux minimal qui ne permet plus une opsonisation efficace par le C3b (Sadallah et Schifferli 2018). En l'absence de MBL, la protection est diminuée et rend ces enfants susceptibles surtout aux infections des voies respiratoires (Sadallah et Schifferli 2018).

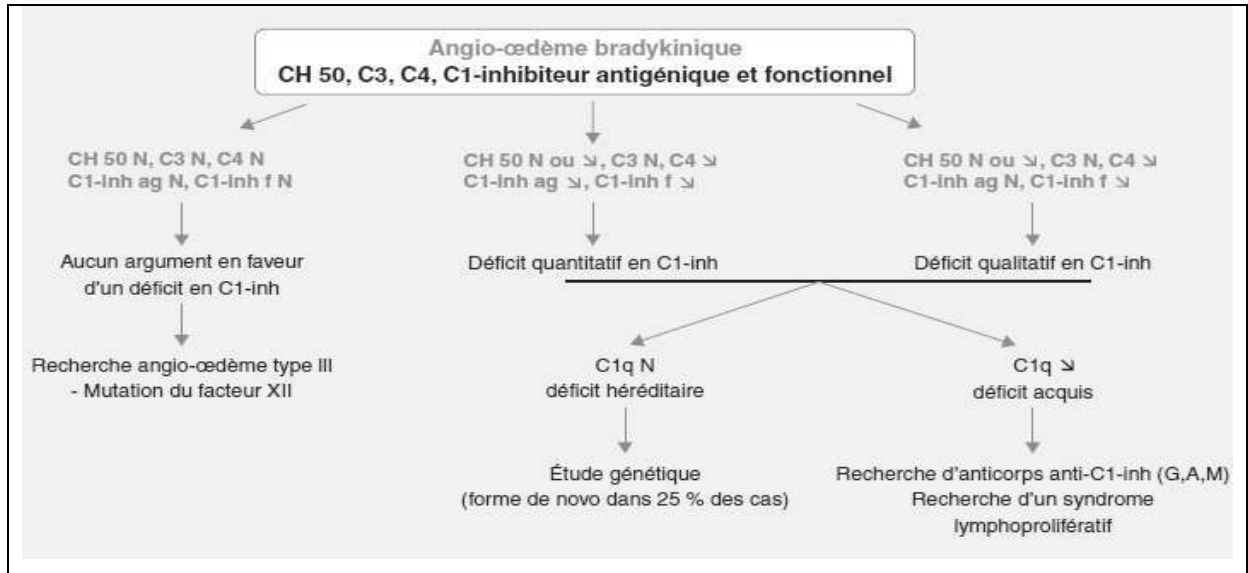


**Figure 7 :** Exploration du complément dans le cadre d'une recherche d'un déficit immunitaire (Rosain, et al. 2014a).

### I.6.3.- Déficits des inhibiteurs du complément

Les déficits en C1-inhibiteur occasionnent un emballement des phénomènes de la perméabilité vasculaire. Le C1-inhibiteur est responsable de l'inhibition de l'activation de la C1-estérase mais aussi de facteurs impliqués dans la coagulation, dans la fibrinolyse et dans le système des kinines, la quantité de kinines augmente et la perméabilité vasculaire permet des formations d'angio-oedèmes dans l'ensemble du corps (CAUBET, et al. 2003). Les angio-oedèmes (AO) héréditaires anciennement appelés « oedèmes angio-neurotiques » sont caractérisés par la survenue d'oedèmes récidivants cutanés ; mains, pieds, visage, parties génitales, autres localisations ; ou muqueux ; ractus gastro-intestinal, voies aériennes (Longhurst et Cicardi 2012). Les manifestations cliniques sont dues à l'accumulation de kinines, qui sont un groupe de peptides qui modifient la perméabilité des capillaires. La molécule de base qui contrôle la kinine est l'inhibiteur C1 (C1inh). C'est une sérine protéase, qui contrôle l'activation du complément et le système de contact de la coagulation sanguine (Sadallah et Schifferli 2018). Pendant la période d'instabilité du système, la concentration de C1inh dans le plasma diminue et le système d'exposition ne peut pas être contrôlé. La libération de bradykinine entraîne une augmentation temporaire de la perméabilité vasculaire, conduisant à un oedème défini non prurigineux se reproduisant à différentes fréquences (Sadallah et Schifferli 2018). Un oedème de moins de 72 heures peut

être asymétrique et il n'y a pas de réaction allergique associée de région de la gorge, de survenue de crise de douloureuse abdominale ainsi que la notion d'antécédents familiaux (Longhurst et Cicardi 2012).



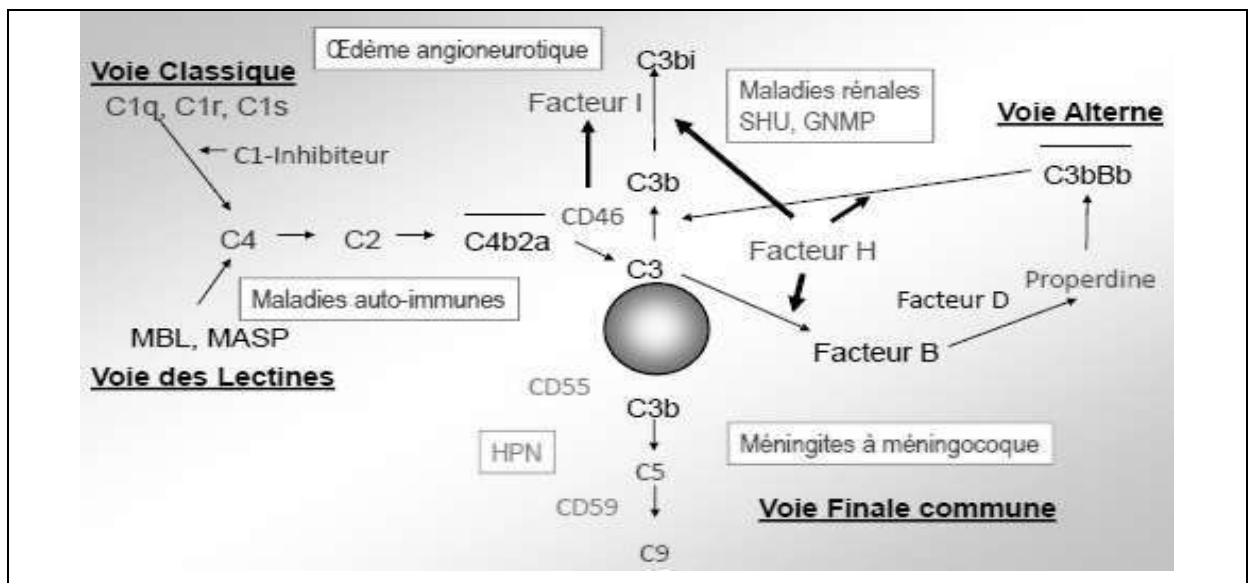
**Figure 6 :** Angio-œdème bradykinique et recherche d'un déficit en C1 inhibiteur (Rosain, et al. 2014a).

#### I.6.4.- Déficiences de la voie alterne (pathologies rénales)

Les déficiences de la voie alterne entraînent majoritairement des pathologies rénales. Le complément s'active à la surface de composants circulants ; sanguins ; par défaut de contrôle de cette voie. Les plus représentatifs ; le syndrome hémolytique et urémique où une hémolyse intravasculaire entraîne une dysfonction rénale ; l'hémoglobinurie nocturne paroxystique (Puissochet 2016). Certaines études récentes ont montré que plusieurs pathologies rénales étaient associées à une dérégulation de la voie alterne du complément comme la forme atypique du syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou les glomérulonéphrites membrano-prolifératives (GNMP). Des anomalies génétiques et différents auto-anticorps ont été mises en évidence chez des patients présentant ces pathologies, détruisent les fonctions des protéines régulatrices plasmatiques ; facteur H, facteur I ; ou membranaire ; CD46 ou MCP, ou autre C3 convertase alterne ; complexe C3bBb (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi 2006). Parmi ces pathologies l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), une maladie caractérisée par une anémie hémolytique, par des thromboses et par une hypoplasie médullaire d'intensité variable. Elle est due à des mutations somatiques du gène *PIG-A* impliqué dans la fabrication de l'ancre glycosylphosphatidylinositol ; GPI (Sadallah et



Schifferli 2018). Les cellules issues des cellules souches hématopoïétiques mutées, dont les globules rouges, n'expriment plus à leur surface les récepteurs CD55 et CD59, ce qui les rend sensibles à la lyse par le complément (Michaël, et al. 2013). Ces deux molécules inhibitrices du complément sont indispensables pour protéger l'érythrocyte de l'attaque du complément (Wong et Kavanagh 2018). Le système du complément est caractérisé par une cascade enzymatique en quasi activation permanente et seul le contrôle est effectué par des molécules inhibitrices permettant l'équilibre. Sans le CD55 qui réduit la déposition de C3b et le CD59 qui interfère avec la formation du complexe d'attaque dans membrane, l'érythrocyte sera détruit ; lyse intravasculaire (Sadallah et Schifferli 2018).



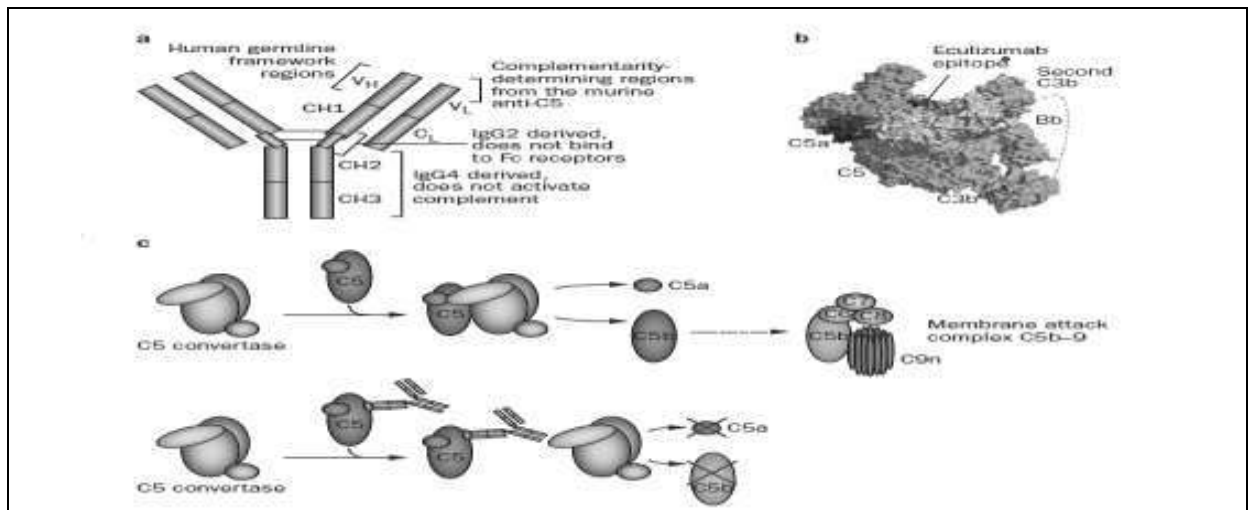
**Figure 9** : Déficiences en protéines du Complément et pathologies (Michaël, et al. 2013; Sadallah et Schifferli 2018)

## I.7.- Médicaments à activité anti complément

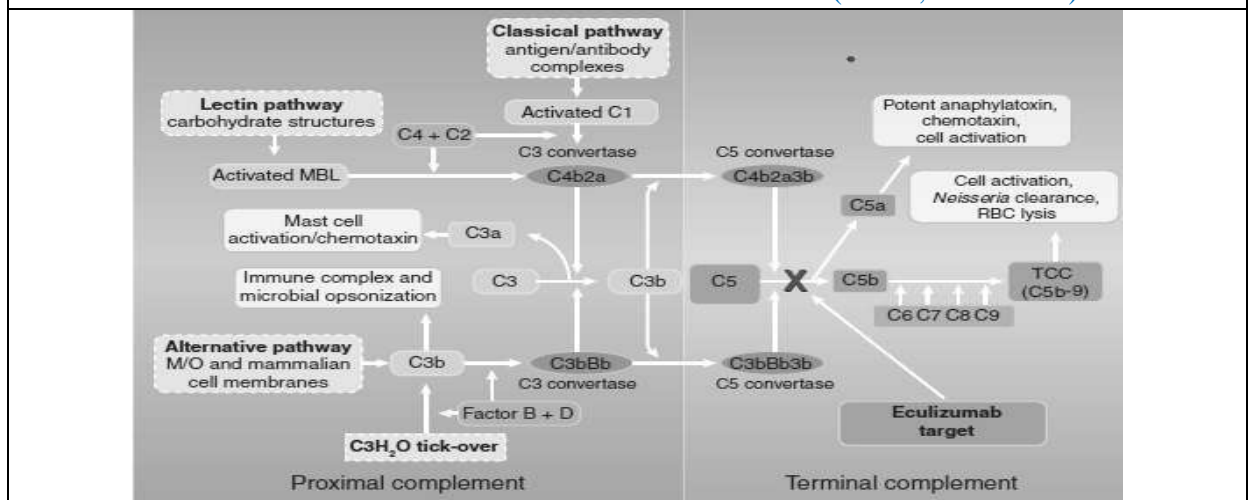
### I.7.1.- L'éculizumab

L'éculizumab ; ECU reste le premier inhibiteur de système du complément utilisé en pratique clinique. C'est un anticorps monoclonal hybride IgG2/IgG4 kappa comprend les régions CH1 et les régions charnières de l'IgG2 humain fusionnées aux régions CH2 et CH3 de l'IgG4 humain (Wong et Kavanagh 2015; Rother, et al. 2007). L'ECU se lie à C5, inhibant son clivage en C5a et C5b, empêchant ainsi la libération du médiateur inflammatoire C5a et la formation du pore cytolitique terminal du complément C5b-C9 ; complexe soluble d'attaque membranaire, sMAC. Il a été approuvé par la Food and Drug Administration américaine et l'Agence européenne des médicaments en 2007 pour le traitement de maladies rares telles que l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (PNH) et en 2011 pour le traitement du syndrome

hémolytique et urémique atypique (aHUS) ) et la myasthénie réfractaire (Bomback, et al. 2012; Wong et Kavanagh 2015; Zuber, et al. 2012).



**Figure 7:** Structure moléculaire et mode d'action du éculizumab; a : Représentation schématique de la structure de l'éculizumab ; b : Structure tridimensionnelle qui présente le mécanisme d'action moléculaire de l'éculizumab ; c : Représentation schématique du mécanisme d'action moléculaire de l'éculizumab (Zuber, et al. 2012) .



**Figure 8 :** Blocage ciblé de la protéine C5 du complément (Rother, et al. 2007).

### I.7.2.- Le ravulizumab

C'est un nouvel anticorps monoclonal thérapeutique inhibiteur de C5 (Kulasekararaj, et al. 2019) dont la demi-vie est plus longue que celle de l'éculizumab. Le contrôle du blocage complet du complément par l'éculizumab a permis une thérapie personnalisée dans des contextes spécifiques. Une action similaire est attendue avec le ravulizumab (Willrich, et al. 2021). C'est un anticorps hybride IgG2/IgG4 à action prolongée (145Kg). Sa séquence est très similaire à celle de l'éculizumab (148KDa), à l'exception d'une différence de 4 acides

aminés dans la chaîne lourde de la molécule (Stern et Connell 2019) qui lui confèrent une plus grande affinité pour le récepteur de l'immunoglobuline FcRn et modifient l'affinité de la molécule pour le C5 (Willrich, et al. 2021).

## **II.- Activités biologiques des polysaccharides**

Les polysaccharides végétaux ont des activités biologiques diverses, à savoir des activités antitumorales, antioxydantes (Zhang, et al. 2013), antivirales (Talarico, et al. 2005), anticoagulantes (Athukorala, et al. 2006), anti-inflammatoires (Wu, et al. 2007), antiulcéreuses, hypoglycémiantes (Tong, et al. 2008) et anti-compléments (Xu, et al. 2007).

### **II.1.- Activité anti-complément**

Le terme "activité anti-complément" fait référence à l'inhibition observée de l'hémolyse due à l'interaction entre les protéines du complément et le polysaccharide. Le test ne fait pas la différence entre l'activation et l'inhibition du système du complément, mais il montre que le système du complément est affecté par la présence de certains polysaccharides et est utilisé pour des tests préliminaires dans la recherche de polysaccharides biologiquement actifs (Samuelsen, et al. 1998). De nombreux agents d'origine naturelle ont bloqué efficacement l'activation du complément. ce qui ouvre de grandes perspectives pour le développement de nouveaux médicaments anti-complémentaires non toxiques et à faible coût à partir de ressources végétales abondantes. Les agents anti-complémentaires les mieux décrits sont les polysaccharides (Lee, et al. 2003; Zhang, et al. 1997). L'héparine est l'un des agents les mieux décrits qui montrent une profonde inhibition de l'activation du complément. Il peut également induire des effets secondaires indésirables qui sont associés à sa propriété anticoagulante (Hogwood, et al. 2020; Ling, et al. 1995). Est un copolymère hautement sulfaté de l'acide uronique et de glucosamine. Les groupes sulfates de l'héparine ont été signalés comme un facteur crucial pour les activités d'anti coagulation et anti-complémentaire (Weiler, et al. 1992).

Tableau 6- Activité anticompément des polysaccharides.

Espèce	Polysaccharide	Composition	Propriété	Références
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	<b>Fucoïdane</b>	<p><b>*KCW:</b> Fuc 37.07%, UA, SO4 24.21% Man 0.12%, Rha 0.05%, GlcA 0.09%, Glc 0.06%, Gal 0.08%, Xyl 0.02%, Fuc 1%</p> <p><b>*KCA:</b> Fuc 40.43%, UA, SO4 35.49 %, Man 0.05%, Rha 0.02%, GlcA 0.06%, Glc 0.02%, Gal 0.03%, Xyl 0.02%, Fuc1%</p>	<p>*Hétéropolysaccharides</p> <p>*Polysaccharides constitués de fucooligosaccharides sulfatés , de galactofucooligosaccharides sulfatés et de méthylglycosides de fucooligosaccharides mono-sulfatés/multi-sulfatés.</p> <p>*La modification du poids moléculaire et de la teneur en sulfate a influencé les niveaux d'activité anticompément</p>	(Zhang et al, 2015)
<i>Asco- phyllum nodosum</i>	<b>Fucane</b>	<b>BS8:</b> Fuc 45%, UA 9%, Sulfate 28%	<p>*Poids moléculaire 22600g/mol</p> <p>*Polysaccharide anionique sulfaté</p> <p>*Composés d'unités d'a-L-fucose-4-sulfate hautement ramifiées (1-2) ou (1-3) liés à des unités d'a-L-fucose-4-sulfate.</p> <p>*Présence de résidus sulfate est susceptible d'être critique pour l'effet anti-complément du fucane</p> <p>*Les groupes hydroxyl des fucanes puissent servir d'accepteurs pour C3b et C4b.</p>	(Blondin et al, 1994)
<i>Saccharina japonica</i>	<b>Fucoïdane</b>	<p><b>SJW:</b> Fuc 22.38 % , UA10.32%, SO4 30.60 % Man0.10%, Rha 0.03%, GlcA 0.15%, Gal 0.63%, Xyl 0.07%, Fuc 1%</p> <p><b>SJS:</b> Fuc 34.97 % , UA 3.44 % , SO436.88 % Man 0.06 % , Rha 0.03 % , GlcA 0.06 % , Glc 0.01 % , Gal0.11 % , Xyl 0.02 % , Fuc 1 %</p>	<p>*Hétéropolysaccharides sulfatés et galactofucane ou fucane sulfatés</p> <p>*Contient du glucuronomannane sulfaté, du glucuronane, du galactane</p> <p>*SJW 152.4KDa</p> <p>*SJS 106.3 KDa</p> <p>*L'activité anti-complément a été attribuée au rapport molaire du galactose au fucose et le pourcentage du sulfate.</p>	(Jin et al, 2016)
<i>Hizikia fusiforme</i>	<b>Fucoïdane</b>	<b>HFS:</b> Fuc 21.89 % , UA1.98 % , SO <sub>4</sub> 30.59 % , Rha 0.01%, GlcA0.09%, Glc1.22%, Man0.07%, Gal0.25%, Xyl0.02%, Fuc 1%	<p>*Hétéropolysaccharides sulfatés et galactofucane ou fucane sulfatés</p> <p>*Contient du glucuronomannane sulfaté, du glucuronane, du galactane</p>	(Jin et al, 2016)

		<p><b>HFW:</b> Fuc 28.04 %, UA 5.43%, SO<sub>4</sub> 28.46 %, Man 0.11%, GlcA 0.08%, Glc 0.62%, Gal 0.27%, Xyl 0.09%, Fuc 1%</p>	<p>*HFS 97.3/3.6 KDa *HFw 118.3/3.9 KDa *L'activité anti-complément a été attribuée au rapport molaire du galactose au fucose et le pourcentage du sulfate</p>	
<i>Artemisia annua</i>	Polysaccharide AAP	<p><b>AAP01-2 :</b> mannose, rhamnose, acide galacturonique, glucose, galactose et arabinose à différents rapports molaires de 1,1:1,8:2,5:0,9:1,4:1,1 et 1,5:1,4:1,3:1,0:2,3:1,3, respectivement et acide glucuronic *liée en <math>\alpha</math>-GlcP-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>3)-<math>\alpha</math>-Rhap-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-Rhap-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>3,5)-<math>\alpha</math>-Araf-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-GalpA-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-6MeGalpA-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>5)-<math>\alpha</math>-Araf-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>6)-<math>\beta</math>-Manp-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\beta</math>-Manp-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>3,6)-<math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>,</p> <p><b>AAP01-3:</b> mannose, rhamnose, l'acide galacturonique, glucose, galactose et arabinose à différents rapports molaires de 1,5:1,4:1,3:1,0:2,3:1,3, respectivement * liée en <math>\alpha</math>-GlcP-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\alpha</math>-Araf-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>3,4)-<math>\beta</math>-Manp-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>3)-<math>\alpha</math>-Rhap-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\alpha</math>-Rhap-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-GalpA-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math> 3,5)-<math>\alpha</math>-Araf-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>3,6)-<math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>3,4,6)-<math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow</math>3)-<math>\beta</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math> and <math>\rightarrow</math>4)-<math>\beta</math>-Manp-(1<math>\rightarrow</math></p>	<p>*Acide hétéropolysaccharides *AAP01-2 139.78 kDa *AAP01-3 49.64 kDa *Le carboxyl-reuite de l'acide galacturonique et le pourcentage d'acide galacturonique est susceptible d'être critique pour l'effet anticomplément.</p>	(Huo et al, 2020)
<i>Juniperus pingii</i>	Polysaccharide acide XB-PS3	<p>*Composé d'arabinose, d'acide galacturonique et de mannose dans un rapport molaire de 0.58:0.33:0.09 *2,4<math>\rightarrow</math><math>\alpha</math>-Manp-(1<math>\rightarrow</math> et <math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-GalpA-(1<math>\rightarrow</math> (estérifié à 60 %), avec une branche arabannique. attachée à O-2 de <math>\rightarrow</math>2,4)-<math>\alpha</math>-Manp-(1<math>\rightarrow</math></p>	<p>*PM :86.04 kDa *La teneur en sucre total de XB-PS3 était de 96,75 % et la teneur en acide uronique de 25,68 % *L'arabinose et particulièrement l'acide galacturonique étaient des caractéristiques importantes des polysaccharides anti-complément</p>	(Xia et al, 2020)
<i>Bupleurum</i>	D3-S1	Ara, Gal et GalA,Rha, Glc, Xyl et Man.	2000 kDa	(Xia et al, 2020)

<i>smithii</i>				
<i>S. asperum</i>	HMW-LSA	Rha 0.6 %, Ara 1.2 %, Xyl 0.2 %, Glc 0.25 % , Gal 1.0% Frucl.8% et acide Uronique 6.5%	> 1000 kDal	Barbakadze et al, 2011)
<i>Prunella vulgaris</i>	polysaccharides acide PW-PS	<p><b>*PW-PS1 :</b> composé d'Ara, de Xyl et de 4-méthoxy-Glc A Rapport de 1,0 : 2,6 : 0,8.</p> <p>*Les principales liaisons des résidus de sucre de PW-PS1 comprenaient des <math>\beta</math>-D-Xylp terminaux, des <math>\beta</math>-D-Xylp liés à 1,4 <math>\beta</math>-D-Xylp, l'<math>\alpha</math>-D-Arap à liaison 1,3, l'<math>\alpha</math>-D-Arap à liaison 1,3,5 et le 4-méthoxy-<math>\alpha</math>-D-GS1 à liaison terminale. 4-méthoxy-<math>\alpha</math>-D-Glcp A</p> <p><b>*PW-PS2 :</b> composé de Rha, Ara, Xyl, Gal et Gal A dans un rapport de 0,6 : 1,0 : 1,3 : 1,8 : 3,4 rapport de 0,6 : 1,0 : 1,3 : 1,8 : 3,4.</p> <p>*Les principales liaisons entre les résidus de sucre de PW-PS2 comprenaient l'Araf terminal, le <math>\beta</math>-D-Xylp lié au 1,4, le <math>\alpha</math>-D-Rhap lié au 1,3, le <math>\alpha</math>-D-Galp terminal et le Gal A lié au 1,3. <math>\alpha</math>-D-Galp, et <math>\alpha</math>-D-Galp 1,4,6-liée.</p>	<p>*PW-PS1 300 kDa</p> <p>*PW-PS2 8 kDa</p> <p>*Pourcentages élevées d'arabinose 12.3%,galactose 22.2% et d'acide galacturonique42.0% et le rapport élevées des groupements carboxyliques réduites produits.</p>	(Du et al, 2016)
<i>Taraxacum mongolicum Hand -Mazz</i>	DPSW-A	Composé de trois types de monosaccharides, à savoir le rhamnose, l'arabinose et le galactose, dans un rapport molaire de 1,0:10,7:11,9. La chaîne principale du DPSW-A contient du Terminal-Galp, du 1,3-Galp, du 1,6-Galp, du 1,3,6-Galp et du 1,2,4-Rhap ; la chaîne ramifiée contient du Terminal-Araf, du 1,5-Araf et du 1,3,5-Araf.	*PM: 80.813 kDa	(Chen et al, 2016)
<i>Juniperus tibetica Kom</i>	Polysccharides acide YB-PS4	<p>*Composé de <math>\rightarrow 2,4</math>)-<math>\alpha</math>Rhap-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow 3,5</math>)-<math>\alpha</math>-Araf-(1<math>\rightarrow</math>, <math>\rightarrow 2,4</math>)-<math>\alpha</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math> et <math>\rightarrow 4</math>)-<math>\alpha</math>-GalpA-(1<math>\rightarrow</math>, avec des branches de <math>\rightarrow 2</math>)-<math>\alpha</math>-Rhap-(1<math>\rightarrow</math>,<math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-Araf-(1<math>\rightarrow</math> et <math>\rightarrow 2</math>)-3-O-Me-<math>\alpha</math>-Galp-(1<math>\rightarrow</math>.</p> <p>*Araf-(1<math>\rightarrow</math> 0.069</p> <p>*Rhap-(1<math>\rightarrow</math> 0.066</p>	<p>*Teneur totale en sucre de YB-PS4 96,69 % *Teneur en acide uronique de YB-PS4 20,34 %.</p> <p>*Sa structure a été élucidée comme étant un glucane simple avec .</p> <p><math>\rightarrow 4,6</math>)-<math>\alpha</math>-Glcp-(1<math>\rightarrow</math> et <math>\rightarrow 3</math>)-<math>\alpha</math>-Glcp-(1<math>\rightarrow</math> comme chaîne principale et <math>\alpha</math>Glcp-(1<math>\rightarrow</math> comme branche</p> <p>*Les diverses compositions de monosaccharides et les</p>	(Xia et al, 2019)

		<ul style="list-style-type: none"> <li>* →3)-Araf-(1→ 0.071</li> <li>*Galp-(1→ 0.154</li> <li>*→2)-Rhap-(1→0.061</li> <li>* →3,5)-Araf(1→0.069</li> <li>*→2,4)Rhap(1→0.071</li> <li>* →4)-Galp-(1→ 0.198</li> <li>* →2)-3-O-Me-Galp-(1→ 0.142</li> <li>* 2,4)-Galp-(1→ 0.140</li> </ul>	les longues branches pourraient être bénéfiques à l'activité anti-complement.		
riz dégraissé	hétéro polysaccharide RBPS2a	*Consistant en des résidus D-galacopyranosyle à liaison β-(1_3) substitués en O-2 par des résidus glycosyle composés de résidus liés α-D-xylose-(1_4)-α-D-arabinose -(1_ et α-D-glucose-(1_4)-α-D-arabinose-(1_	*PM: 90000 Da	(Wang 2008)	etal,

*Chapitre II :*  
*Matériel et Méthodes*



## II.- Matériel et méthodes

### II.1.- Principe d'étude

Le système du complément fonctionne principalement comme la première ligne de défense contre les infections pathogènes (Noris et Remuzzi, 2013). L'activation incontrôlée ou involontaire de ce système via la voie alternative, et avec manque des traitements, peut causer des divers pathologies compliquées (Valenzuela et al, 2000). Depuis l'introduction du médicament le plus cher au monde ; Eculizumab ; dans la thérapie de nombreuses maladies impliquant la physiopathologie de la voie alternative du complément (ACP), le besoin non satisfait de réaliser des tests ACP simples et abordables pour tous les pays est devenu l'un des défis majeurs de la médecine contemporaine (Kerboua et Djenouhat, 2020). Pour cette raison la recherche vise de nouveaux principes actifs d'origine naturelle comme les substances isolées à partir des plantes, puisque ces substances représentent près de 60% des médicaments dont nous disposons (Shi, 2016). Parmi ces biomolécules les polysaccharides qui jouent des rôles multiples et possèdent un immense potentiel dans les secteurs de la santé, de l'alimentation et des cosmétiques, en raison de leurs effets thérapeutiques et de leur toxicité relativement faible (Shi, 2016). Ils ont une variété d'activités biologiques, y compris l'activité anti tumorales, antivirales et anti-inflammatoires (Shi, 2016), immun modulateur (Huo et al, 2020), antioxydants, anticoagulant, hypoglycémiant (Boual et al, 2015) anti-ulcère, immunostimulante et anti-complément (Chen et al, 2010).

La recherche sur le complément est généralement effectuée dans le sérum et repose sur deux types de tests: l'analyse immunochimique qui permet de quantifier divers composants du complément et les tests fonctionnels basés sur la recherche sur la réaction hémolytique sur l'activité hémolytique de l'ensemble ou des composantes du complément (Frémeaux-Bacchi et al, 1994) Et compte tenu de ces propriétés pharmacologiques des polysaccharides ils peuvent être utilisés dans le domaine de la phytothérapie du système immunitaire comme des anti-compléments pour valoriser ces substances bioactives des plantes médicinales traditionnellement utilisées comme médicaments pour diverses maladies (Xia et al, 2019). Cette étude recherche l'activité anti-complément des oligosaccharides extraits d'une plante spontanée à caractère médicinale de la région de Ghardaïa. Il s'agit de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae). L'étude de l'activité anti-complément des oligosaccharides in vitro vise à déterminer la capacité des ces biomolécules à inhiber la lyse des globules rouges causée par le complexe d'attaque membranaire formée après l'activation de la voie alterne du complément.

L'objectif de notre étude est de montrer le pouvoir immuno-modulateur des oligosaccharides obtenus après hydrolyse partiel des polysaccharides isolés de *P.notata* Lagasca (Plantaginaceae) vis-à-vis le système du complément et de confirmer que ces molécules bioactives inhibent la voie alterne du complément d'une manière dose dépendante

comme le cas de plusieurs études antérieures afin d'avoir une idée sur les limites de la plage des concentrations correspondantes aux taux d'inhibition optimales expérimentalement.

## **II.2.- Matériel d'étude**

### **II.2.1.- Solvants et réactifs**

La nature, l'origine, la masse molaire, la densité et la pureté des solvants et des réactifs utilisés au cours de ce travail sont indiquées dans le tableau N° 8.

#### **II.2.1.1.- Solutions tampons**

Les solutions utilisées dans ce test, (ACP); tampon de la voie alterne qui contient le PBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> dont les portions (10/1/1 V/V) d'un pH neutre (Jeong et al, 2004), (PBS) ; solution saline tamponnée au phosphate (Servais et al, 1991).

La nature, la concentration, le rôle, la composition et la méthode de préparation des solutions, de MgCl<sub>2</sub>, et d'HCl, NaOH et EGTA utilisées dans la préparation des solutions tampons sont indiquées dans le tableau N° 9.

##### **II.2.1.1.1.- Tampon de la voie alterne (ACP), pH neutre**

Est du PBS contenant 100mM d'acide éthylène glycol-bis (β-aminoéthyl éther)N,N',N'-tétraacétique (EGTA) et 7 mM MgCl<sub>2</sub> ; La voie alterne ne nécessite pas des ions Ca<sup>2+</sup> pour l'activation, mais elle nécessite des ions Mg<sup>2+</sup> (Jeong et al, 2004; Kerboua et Djenouhat, 2020). Ainsi, l'activation de la voie alternative se fait en présence de Mg<sup>++</sup>/EGTA, qui chélate les ions de Ca<sup>2+</sup>, donc la voie classique est bloquée par ce réactif (Jeong et al, 2004).

##### **II.2.1.1.1.1.- Mode opératoire**

1. Dans un bécher contenant 500ml du PBS ajouter 50ml d'EGTA à concentration 100 mM et 50ml de MgCl<sub>2</sub> à concentration 7mM pour obtenir l'ACP : PBS/EGTA/ MgCl<sub>2</sub> dont les portions **10/1/1 V/V** ;
2. Marquer toutes les bouteilles clairement, en écrivant l'état de stérilité (stérile/non stérile) et la date de préparation sur l'étiquette ;
3. Stocker à température ambiante.

##### **II.2.1.1.2.- Tampon PBS, PH 7,2**

La solution saline tamponnée de phosphate (PBS) est une solution isotonique qui est utilisée dans de nombreuses applications de recherches biologiques. Elle est composée de 8g Chlorure de sodium NaCl (137Mm), 0,2g de Chlorure de potassium KCl (2,7mM), 0,2g de Dihydrogénophosphate de potassium anhydre KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5mM), et 0,92g d'Hydrogénophosphate disodique anhydre Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8,1mM) (Servais et al, 1991 ; YOUNG et al, 2012).

### II.2.1.1.2.1.-Mode opératoire

Le tampon PBS (Phosphate Buffer Salin) PH:7,2 est préparé selon (YOUNG et al, 2012 ; Servais et al, 1991) , comme il est indiqué ci-dessous

1. Peser tous les sels et placer dans un bécher et introduire le barreau magnétique ;
2. Ajouter 800ml d'eau distillée aux sels ;
3. Placer le bécher sur l'agitateur magnétique et une fois que tous les sels sont dissous, ajuster le volume de la solution au volume 1000ml ;
4. Ajuster le pH de la PBS à pH 7,2 avec de l'HCl 1N ;
5. Répartir le PBS dans des bouteilles et autoclaver à 121°C pendant 20 minutes et marquer toutes les bouteilles clairement, en écrivant l'état de stérilité (stérile/non stérile) et la date de préparation sur l'étiquette ;
6. Stocker à température ambiante.

### II.2.1.2.- Gel d'agarose

#### II.2.1.2.1.- Mode Opératoire

Le gel d'agarose est préparé selon (Kerboua et Djenouhat, 2020; Valenzuela et al, 2000), comme il est indiqué ci-dessous ;

1. Chauffer le stock d'agarose à 2% et, à l'aide d'une pipette stérile prélever un volume de 12,25 ml dans des flacons et conserver à 56°C ;
2. Ajouter les 9.8ml du tampon ACP réchauffé (56°C) à chaque bouteille d'agarose fondu et laisser refroidir l'agarose dilué à 45°C.

**Tableau 7-** Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation

Produits	Fournisseur	Type	Fabrication
Agitateur magnétique	VELP CSIENTIFICA		F20520162 EUROPE
Autoclave	WEBECO	WEBECKE. P : 2.5BAR, T :138Oc	/
Bain marie	MEMMERT	MEMMERTGMBH. NENNTEMP;95 0C	GERMANY
Balance	OHAUS	DISCOVERY DV 215CD OHAUS	USA.
Etuve	MELAG	MELAG815.220V, 50HZ, 12.3A, 2700w.	GERMANY
Hotte	TEL STAR	TELSTAR AV-100. MODELE50/60 HZ, 0.6KW.	SPAIN
Micropipette	SOCOREX	ACURA 821. 200-1000ML	SWIS
pH metre	WTW	WTW.D-82362. PH 1970.	GERMANY

**Tableau 8-** Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation.

Produits	Fournisseur	Caractéristiques				
		Forme	Formule chimique	M.molaire g/mol	Densité g/cm <sup>3</sup>	Pureté %
Chlorure de magnésium hydrate	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	203,30	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
Hydroxyde de sodium	EDEN LABO	Poudre	NaOH	39.997	2.13	99
Méthanol	SCHARLAU	Poudre	CH <sub>3</sub> OH	32.04	0.79	99.9
Acide tri-fluoro-acétique(TFA)	SIGMA ALDRICH	Liquide	CF <sub>3</sub> COOH	114,02	1,49	99.8
Phosphate de potassium dibasique	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	KH <sub>2</sub> Po4	136.09	2.338	99
Hydrogénophosphate disodique	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	Na <sub>2</sub> HPo4	141,96	1.63	99.5
Chlorure d'hydrogène	SIGMA-ALDRICH	Liquide	HCl	36,458	1.19	37
Ethylène Glycol Bis (β-aminoethyl ether)-N.N.N'.N'-tetraacetic acid)	SIGMA-ALDRICH	Poudre	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	380,35	1.4	97
Gel d'agarose		Liquide				

**Tableau 9-** Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation

Solution	Molarité	Nature	Etat	Rôle	Méthode de préparation
EGTA	100Mm	Acide	Stérile	Ethylène Glycol Bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) avec des ions $Mg^{2+}$ ne chélate que le $Ca^{2+}$ et bloque spécifiquement la voie classique.	Ajouter 3,8g à environ 20ml d'eau distillée dans un bécher, placer le bécher sur l'agitateur magnétique puis compléter jusqu'à le volume final de 100ml. Ajuster le pH avec l'HCl à pH 8. Stériliser à l'autoclave, et marquer les bouteilles clairement, en écrivant l'état de stérilité et la date de préparation sur l'étiquette. Stocker à température de 4°C pendant ~1 mois (Morgan, 2000).
HCl	1N	Acide	Non stérile	Ajustement de PH	Cette solution est préparée en mélangeant 4,165 ml de l'HCl (12N) avec 45,835ml de l'eau distillée.
NaoH	0,1M	Base	Nom stérile	Ajustement de PH	Pour la préparation de 100ml de solution d'hydroxyde de sodum 0,1M il est nécessaire de dissoudre 0,4g de NaoH dans un 100ml d'eau distillée.
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	7Mm	Saline	Stérile	Source des ions $Mg^{++}$	Dissoudre 0,1423g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ de masse molaire dans 80ml d'eau distillée et ajuster le volume à 100ml. Répartir en aliquotes et autoclaver.

## **II.2.2.- Matériel biologique**

Le matériel biologique utilisé est constitué des oligosaccharides isolés d'une plante spontanée à caractère médicamenteux, de la région de Ghardaïa (*Plantago notata* Lagasca). Le sang est prélevé à partir des individus sains.

### **II.2.2.1.- Oligosaccharides**

Les oligosaccharides sont obtenus après hydrolyse partielle des polysaccharides hydrosolubles isolés d'une plante spontanée à caractère médicamenteux, de la région de Ghardaïa (*Plantago notata* Lagasca).

### **II.2.2.2.- Le sang**

Le sang est prélevé à partir des volontaires sains, de sexe masculin, âgé de 20 à 50 ans et (Chung et al, 2011; Xi et al, 2012), le jour même de son utilisation au niveau du laboratoire IBN ROCHD Ghardaïa. L'absence d'antigène HBs, d'anticorps anti-VIH et d'anticorps anti-VHC est vérifiée. Ainsi, le groupement des patients est confirmé (Chung et al, 2011; Xi et al, 2012).

## **II.3.- Méthodologie d'étude**

### **II.3.1.- Activité anti complément des oligosaccharides par la technique hémolytique AP100**

#### **II.3.1.1.- Principe du test**

La technique d'AP100 est une technique hémolytique réalisée sur gel et utilise les érythrocytes humains, afin d'explorer la fonction de la voie alterne du complément par la mesure de la lyse des érythrocytes humains causée par le sérum humain normal ; SHN (Rosain et al, 2014; Servais et al, 1991). Le dosage d'AP100 apprécie l'activité fonctionnelle globale de la voie alterne sur des boîtes d'agarose- érythrocytes humains, en mesurant la lyse des érythrocytes en présence du sérum contenant les éléments du complément dans des conditions expérimentales limitées où seulement la voie alterne est initiée et étudiée (Frémeaux-Bacchi et al, 2012). Les dosages hémolytiques y compris l'AP100 permettent de mesurer l'activité fonctionnelle des protéines du complément (Frémeaux-Bacchi et al, 2012). Les tests hémolytiques consistent à déterminer le volume du sérum de patient capable d'entraîner un certain taux de lyse d'un nombre donné de globules rouges estimé à partir des zones d'hémolyse après la diffusion radiale (Frémeaux-Bacchi et al, 2012). En ce qui concerne l'AP100, le taux de lyse des érythrocytes par les éléments de la voie alterne du complément est de 100 % comme le nom l'indique (Frémeaux-Bacchi et al, 2012). Le dosage hémolytique par la technique AP100 nous permet d'évaluer la capacité de certaines substances d'origine naturelle ayant des activités biologiques, comme les oligosaccharides, à moduler la voie alterne du système du complément.

### **II.3.1.2.- Mode opératoire**

#### **II.3.1.2.1.- Prélèvement du sang**

Selon (Médaille et al, 2005), les principales étapes de prélèvement sanguin sont les suivants ;

1. Repérer la veine, nettoyer la peau à l'alcool à 70° ;
2. Piquer dans la veine puis perforer le bouchon du tube pour y recueillir le sang ;
3. Dès que le sang commence à couler dans le 1<sup>er</sup> tube, relâcher le garrot ;
4. Retourner le tube 2 ou 10 fois pour mélanger le sang à l'anticoagulant ou à l'activateur de coagulation et éviter l'hémolyse ;
5. Eliminer l'aiguille dans un container rigide pour objet contaminés piquants ou tranchants ;
6. Bien comprimer la veine au niveau de la ponction et poser un pansement ;
7. Identifier les tubes.

#### **II.3.1.2.2.- Préparation des hématies pour le test AP100**

Les hématies sont obtenues selon la méthode décrite par (Servais et al, 1991 ; YOUNG et al, 2012; Kerboua et Djenouhat, 2020).

1. Prélever 4 ml du sang des volontaires sains âgés de 20-50 ans ;
2. Verser le sang dans le flacon ou dans les tubes à centrifugation contenant l'anticoagulant et faire tourner doucement le tube pour mélanger le sang ;
3. Remplir le flacon avec le tampon ACP et mélanger doucement ;
4. Centrifuger à 500g pendant 10minutes pour sédimenter les globules rouges ;
5. Aspirer le surnageant le jeter ;
6. Remplir le flacon ou le tube à centrifugation avec l'ACP ;
7. Remettre les cellules en suspension et centrifuger à nouveau pendant 10minutes à 500g, jeter le surnageant et remplir le tube à centrifugation par l'ACP ;
8. Mélanger doucement pour remettre les cellules en suspension et centrifuger pendant 10minutes à 500g, aspirer le surnageant, et le jeter ;
9. Ajouter 6 ml d'ACP au culot de globules rouges pour obtenir une suspension finale de globules rouges de 10% ;
10. Mélanger doucement pour remettre les globules en suspension, transférer la suspension de globules rouges dans une bouteille avec bouchon à vis, l'étiqueter et la stocker à 4°C.
11. Lors de l'utilisation des hématies, placer la suspension cellulaire dans un bain-marie à une température de 46°C.



### II.3.1.2.3.- Obtention des sérums

Les sérums humains sont établis à partir des volontaires sains (âgés de 23-53 ans) par ponction lieu, sans additifs. Après 30 mn à 37°C, le coagulum est formé. Le sérum est séparé de la coagulation par centrifugation à 2000rpm pendant 10 mn (Michaelson et al, 2000)

### II.3.1.2.4.- Préparation des oligosaccharides

Les fractions des oligosaccharides sont obtenues à partir des polysaccharides hydrosolubles isolés des graines de *Plantago notata* Lagasca, une plante spontanée à caractère médicinal, répartis dans la région de Ghardaïa.

#### II.3.1.2.4.1.- Hydrolyse des liaisons glycosidiques

La dépolymérisation des polysaccharides est réalisée par une hydrolyse acide partielle des liaisons glycosidiques. Une quantité de 10mg de polysaccharide de *Plantago notata* Lagasca, est hydrolysée dans un tube en verre a bouchon vissant à l'aide de 1ml de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0.5M pendant 45minutes a 80°C (Boual et al, 2015; Boual et al, 2011; Jin et al, 2020; Wu et al, 2007). Une fois l'hydrolyse est effectuée, l'acide est évaporé dans une boîte de pétri de petit volume sous la hotte après l'ajout de quelques gouttes de méthanol aux hydrolysats (Chen et al, 2016; Xia et al, 2020).

#### II.3.1.2.4.2.- Préparation de solution mère et dilution des oligosaccharides

Une solution mère de concentration 1mg/ml de l'extrait des oligosaccharides issus de la plante étudiée est préparée par l'ajout de 1ml de l'hydrolysats de concentration 10mg/ml à 9ml de l'eau distillée. Les dilutions des oligosaccharides 200µg/ml, 400µg/ml, 600µg/ml, 800µg/ml, et 1000µg/ml sont par la suite préparées dans le tampon ACP, voir tableau N° 10.

**Tableau 10-** Méthode de dilution des oligosaccharides de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae)

Concentration (µg/ml)	0	200	400	600	800	1000
Solution mère (µl)	0	200	400	600	800	1000
Tampon ACP (µl)	1000	800	600	400	200	0

**Tableau 11-** Position systématique et usages thérapeutiques des espèces de plantes spontanées à caractère médicinal choisies dans la région de Ghardaïa (Benaoun et al, 2017).

Famille	Nom scientifique	Nom Mzab/Arabe	Vivace/ Éphémère	Répartition	Partie utilisée	Mode d'utilisation	Indications traditionnelles
Plantaginaceae	<i>Plantago notata</i>	Adan / Inim	Éphémère	Commun dans tous le Sahara septentrional et central	Graines	Poudre	Cicatrisation, anti- inflammatoire, constipations

### **II.3.1.3.- Technique hémolytique AP100 et étude de l'activité anti complément**

#### **II.3.1.3.1.- Préparation des boîtes d'AP100**

1. Mélanger le gel, avec 2ml de la suspension de globules rouge 10% préparée précédemment à 45°C;
2. Verser le mélange dans les boîtes Pétri et éliminez les bulles ;
3. Refroidir les boîtes à 4°C pendant 10minutes et percer des trous à l'aide d'une pipette pasteur à au moins 1cm de distance à fin d'obtenir 7puits et conserver les boîtes à 4°C au réfrigérateur.

L'étude de l'inhibition de la voie alterne du système de complément par les oligosaccharides en utilisant la technique hémolytique AP100 basée sur l'incubation dans des boîtes de Pétri, est précédée par trois étapes essentiel

#### **II.3.1.3.2.- Préparation du contrôle négative, SHN**

Le contrôle négatif représenté par le sérum humain normal (SHN) prélevé à partir des donneurs adultes en bonne santé comme source du système du complément (Huo et al, 2020;Jin et al, 2020) est dilué à 1:6 par letampon ACP (Diallo et al, 2001 ;Wang et al, 2016; Lee et al, 2018).

#### **II.3.1.3.3.- Préparation du contrôle positive, héparine**

Les polysaccharides sulfatés notamment l'héparine, modulent un certain nombre de fonctions biologiques et présentent des activités anti-adhésives et anti-inflammatoires. Les propriétés anti-inflammatoires des polysaccharides sulfatés sont médiées en partie par leur capacité à interférer avec la fonction du système de complément où l'héparine inhibe l'activation des deux voies classiques et alterne. L'héparine est un glycosaminoglycane poly anionique (Blondin et al, 1994; Jin et al, 2020)utilisé comme contrôle positif en raison de ses fortes propriétés anti complément in vitro (Liu et al, 2018).

La solution d'héparine utilisée pour notre étude est d'une concentration de 1000µg/ml et qui est sa dose inhibitrice de la voie alterne du complément (Wang et al, 2016). La solution de contrôle positif est préparée par dilution d'une solution initiale de 50mg/ml en utilisant le tampon ACP : PBS/EGTA/Mg<sup>++</sup>.

### **III.3.1.4.- Exploration du test anti complément AP100**

#### **III.3.1.4.1.- Pré-incubation**

Après la dilution des oligosaccharides de *P.notata* Lagasca et l'héparine dans le tampon d'activation de la voie alterne du complément ; ACP , et la préparation des différentes dilutions dans ce tampon ; 200µg/ ml, 400µg/ ml ,600µg/ml ,800µg/ml , 1000µg/ml, on fait une pré-incubation de 25µl de dilutions de chaque échantillon avec du 25µl de SHN dilué à

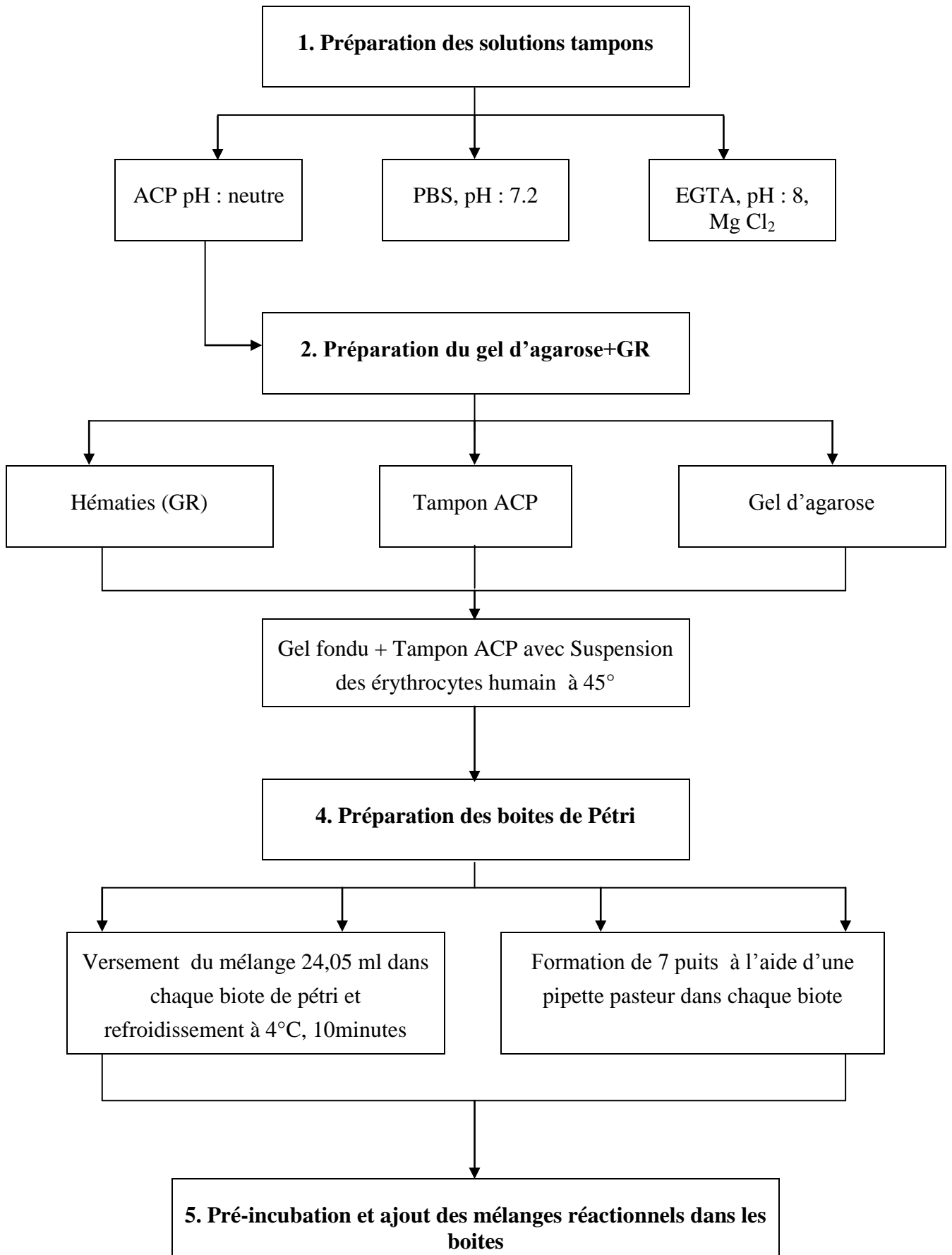
1:6 qui ont été par la suite ajoutés aux puits sur une microplaque et incubés dans un incubateur à 37° C pendant 10minutes (Diallo et al, 2001 ; Wang et al, 2016; Lee et al, 2018).

### III.3.1.4.2.- Incubation

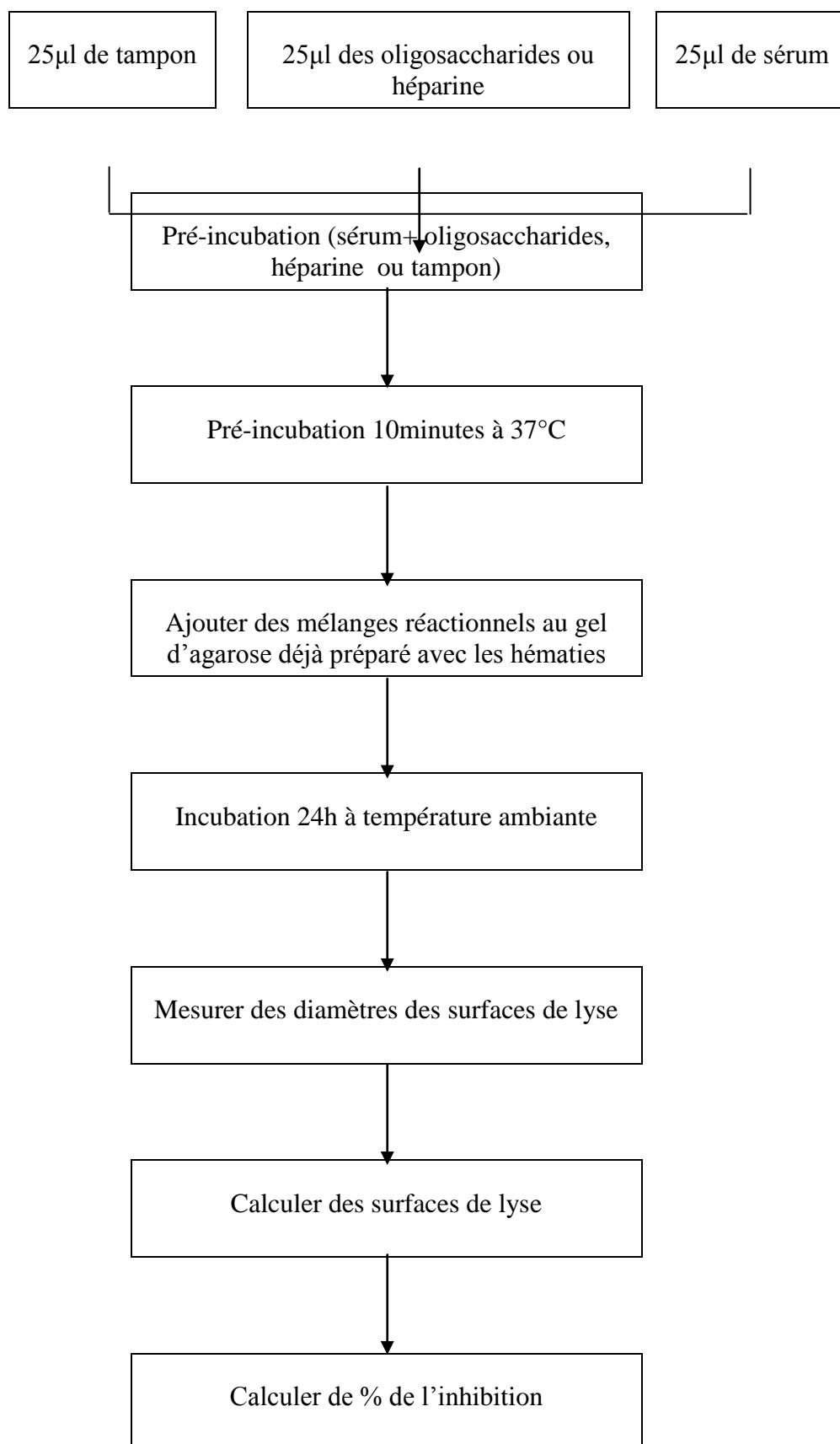
L'incubation des mélanges réactionnels du test anti complément ; oligosaccharides, héparine et SHN est effectuée dans des boites Pétri d'AP100 déjà préparées (Gao et al, 2013). Les boites du test hémolytique AP100 contenant les mélanges réactionnels ; oligosaccharides avec SHN, héparine avec SHN et tampon avec SHN ont été ensuite incubés dans une chambre humide à la température ambiante pendant 24heurs pour permettre une meilleur diffusion radiale des composants du sérum sur le gel (Gao et al, 2013).

Les puits dans chaque boite d'AP100 ont été préparés avec les quantités suivantes pour ;

1. Echantillon: 25µl de chaque dilution de solution des oligosaccharides de *P.natat* Lagasca ; 200µg/ml, 400µg/ml, 600µg/ml ,800µg/ml, 1000µg/ml ;
2. Contrôle positif : 25µl de l'héparine ; 1000µg/ml;
3. Contrôle négatif : 25µl du SHN diluée à 1:6.



**Figure 9** : Schéma de différentes étapes de préparation des boîtes AP100



**Figure 13:** Schéma de différentes étapes de test AP100 (Zhang et al, 2015) modifié

**Tableau 12** - Test anti complément AP100 (7 puits pour chaque boîte Pétri).

Concentrations des oligosaccharides ( $\mu\text{g/ml}$ )		0	200	400	600	800	1000
<b>Contrôle positif</b>	Sérum ; 1:6 ( $\mu\text{l}$ )	/	/	/	/	/	100
	Héparine ( $\mu\text{l}$ )	/	/	/	/	/	100
<i>Plantago notata</i>	Sérum ; 1:6 ( $\mu\text{l}$ )	25	25	25	25	25	25
	Oligosaccharides ( $\mu\text{l}$ )	25	25	25	25	25	25
<b>Contrôle négatif</b>	Sérum ; 1:6 ( $\mu\text{l}$ )	25	/	/	/	/	/
	Tampon ( $\mu\text{l}$ )	25	/	/	/	/	/

- i.** Héparine : Contrôle positif ;
- ii.** Sérum (1 :6) : Contrôle négatif ;
- iii.** Oligosaccharides : Echantillon d'étude.

### III.3.1.4.3.- Calcul

Les zones de lyse obtenues après l'incubation sont mesurées en utilisant un pied à coulisse électronique pour effectuer les mesures de surface de lyse, pourcentage de lyse et taux d'inhibitions.

#### 1. Surface de la lyse

La surface de la lyse est calculée selon l'équation  $S = r^2 \times \pi$  où ; **D** : diamètre des zones de lyse, **r** : le rayon des zones de lyse ( $r = D/2$ ),  $\pi$ : 3,14.

$$S = r^2 \times \pi$$

#### 2. Pourcentage de la lyse

Le Pourcentage de la lyse est calculé en multipliant x 100 le résultat de division de la surface lyse de chaque mélange sur la surface de lyse du SHN

$$\% \text{ de lyse} = (S_{\text{oligosaccharides ou héparine}} / S_{\text{SHN}}) \times 100$$

#### 3. Taux d'inhibitions

Les % de l'inhibition sont calculés comme suivant : 100% - %de lyse de la voie alterne de complément pour chaque fraction des oligosaccharides testée.

$$\% \text{ d'inhibition} = 100\% - \% \text{ de lyse}_{\text{oligosaccharides ou héparine}}$$

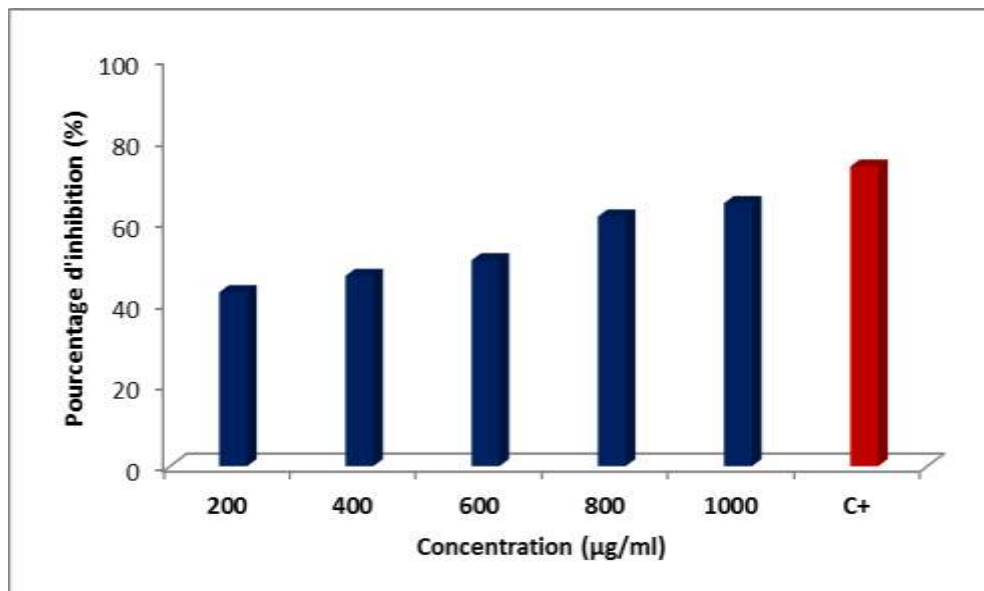


*Chapitre III :*  
*Résultats et discussion*

### III.- Activité anti complément des oligosaccharides via le test AP100

Le dosage par le test hémolytique AP100 explore la fonction de la voie alterne du complément en mesurant la lyse des érythrocytes humain ; par le complément ; en présence de sérum humain normal dont le but de déterminer la dilution de sérum capable de provoquer 100% de la lyse des hématies (Frémeaux-Bacchi et al, 2012). Le test anti complément via la technique AP100 vise à déterminer la concentration des oligosaccharides capable d'inhiber 100% de la lyse des hématies provoquée par le complément contenu dans le SHN en utilisant l'héparine comme contrôle positif.

Les pourcentages de l'inhibition de la lyse des hématies provoquée par l'activation de la voie alterne du complément en présence des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partiel de l'hétéroxylane de *Plantago notata* Lagasca et l'héparine sont représentés dans la figure N°14



**Figure 10:** Histogramme représente les pourcentages de l'inhibition de la lyse des hématies par le complément contenu dans le sérum humain normal en présence des oligosaccharides et en utilisant l'héparine comme contrôle positif.



**Figure 11 :** Test AP100 ; Inhibition de la lyse des hématies par le complément contenu dans le sérum humain normal en présence des oligosaccharides et en utilisant l'héparine comme contrôle positif.

Les résultats obtenus avec le test de détermination du pouvoir de l'inhibition de l'activité de complément via la voie alterne en utilisant la technique hémolytique fonctionnelle AP100 montrent que les oligosaccharides extraits de *Plantago notata*, présentent une activité anti-complément. Où l'effet des oligosaccharides issus de l'hydrolyse de l'hétéroxylane de *Plantago notata* sur l'activation de système du complément humain par la voie alterne a été examiné dans le SHN dilué à 1:6 et l'héparine a été utilisée comme référence. Les oligosaccharides ont bloqué l'hémolyse des érythrocytes de manière dose-dépendante où les pourcentages d'inhibition obtenus sont de l'ordre de 42,73%, 46,75%, 50,62%, 61,36% et 64,64% correspondant respectivement aux concentrations 200  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$ , 600  $\mu\text{g/ml}$ , 800  $\mu\text{g/ml}$ , 1000 $\mu\text{g/ml}$ . Le contrôle positif ; l'héparine a bloqué aussi la lyse des hématies et a présenté une inhibition de 73.63% avec la concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$ . Le taux d'inhibition l'activation de la voie alterne du complément par l'héparine semble relativement élevée à celle des oligosaccharides de *Plantago notata* avec la concentration 1000 $\mu\text{g/ml}$ .

Les érythrocytes de lapin, dont la surface cellulaire est pauvre en résidus sialiques, sont spontanément activateurs de la voie alterne. Tandis que Les érythrocytes de mouton dont

la surface cellulaire est riche en résidus sialiques sont utilisés comme modèle cellulaire pour évaluer la capacité du facteur H à inhiber l'activation de la voie alterne du complément (Frémeaux-Bacchi and al, 2012), même que les érythrocytes humain riches en acide sialique a charge négative sont des activateur de la voie alterne de complément (Oprea, 2006), et aussi la taille des globules rouges de mouton est inférieure à celles de l'homme donc les hématies humain contient plus des résidu sialique que les hématies de mouton (Voisin, 1875). Les conditions de l'expérimentation soit l'utilisation du gel d'agarose ou bien des érythrocytes humain ; qui sont les deux des activateurs de la voie alterne du complément ; nous permet donc de confirmer que l'activité anti complément est due aux oligosaccharides.

Les études réalisées précédemment par nombreux des chercheurs montrent que le poids moléculaire constituait un facteur positif important sur l'activité anti-complément (Jin et al, 2016), la teneur en sulfate est aussi nécessaire pour l'activité anti-complément et son effet est influencé par les concentrations des échantillons (Jin et al, 2016), ainsi que les teneurs relativement élevées en acide galacturonique sont importantes pour les activités anti complément des polysaccharides et aussi il a été signalé que des teneurs élevées en arabinose et en galactose sont des conditions nécessaires à l'activité anti-complément des polysaccharides, ainsi que l'existence des ramification pourraient être bénéfiques à l'activité anti-complément (Du et al, 2016; Xia et al, 2019).

En outre, les carboxyles réduits ont perdu l'activité anti complément, ce qui explique l'importance de l'acide galacturonique dans l'inhibition du complément par les polysaccharides au contraire de l'acide glucuronique qui n'a pas d'effet bénéfique sur l'activité anti complément (Huo et al, 2020a), et finalement les groupes hydroxyle des polysaccharides puissent servir d'accepteurs pour C3b et C4b (Blondin et al, 1994).

Les fractions de polysaccharide des graines de *Plantago major*, contenant un hétéroxylane acide ayant une puissante activité anti complément (Samuelsen, 2000), les études ont montré qu'il y'a une relation entre la structure des fractions isolées et leurs activités anti complément (Huo et al, 2020b; Xia et al, 2020). L'hétéroxylane extrait du *Plantago major* à inhiber 90% de la lyse des érythrocytes à 750 µg/ml, qui est une activité inhibitrice très importante.

La fraction obtenue après hydrolyse de l'extrait brut est composée de 37,5% de xylose, 27,6% d'arabinose, 17,3% d'acide galacturonique, 5,2% d'acide glucuronique, 6,8% de galactose, 4,0% de glucose et de traces de rhamnose (Samuelsen et al, 1999). Cette fraction consiste en un squelette de  $\beta$ -D-Xylp lié en (1-4) avec de courtes chaînes latérales attachées en position 2 dans certains résidus de  $\beta$ -D-Xylp liés en (1-4). Les chaînes latérales sont constituées de  $\beta$ -D-Xylp, de  $\alpha$ -L-Araf et de  $\alpha$ -D-GlcpA. Des résidus  $\alpha$ -D-GalpA liés en (1-4) ont également été détectés, en plus de petites quantités de Rhap et de Galp (Samuelsen et al, 1999).

Benaoun et al, 2017, ont fait des analyses structurales par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) et la résonance magnétique nucléaire  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (RMN) des polysaccharides des graines de *Plantago notata* et les résultats ont montré un hétéroxylane avec un poids moléculaire de 2300000g/mol dont le squelette est composé de  $\beta$ -(1,3)-D-Xylp et de  $\beta$ -(1,4)-D-Xylp fortement ramifiés, par les positions (O)-2 et (O)-3 de la  $\beta$ -(1,4)-D-Xylp par diverses chaînes latérales et monosaccharides terminaux tels que  $\alpha$ -L-Araf-(1,3)- $\beta$ -D-Xylp,  $\beta$ -D-Xylp-(1,2)- $\beta$ -D-Xylp, Xylp terminal ou Araf terminal avec des pourcentage molaire ; Xyl 77.4  $\pm$  4.16%, Ara 7.58  $\pm$  3.77%, Rha 9.20  $\pm$  1.84%, Glc 1.00  $\pm$  0.43%, Gal 2.58  $\pm$  0.88% , GalA 2.21  $\pm$  1.76% et acide uronique 4.9%.

L'hétéroxylane extrait de graines de *Plantago notata* possède la même composition osidique que l'hétéroxylane de *Plantago major* a des pourcentage différent avec une teneur en xylose (77.4  $\pm$  4.16 %) et rhamnose (9.20  $\pm$  1.84%) qui semble très importante que celle de la fraction étudiée par Samuelsen et al. (1999) possédant 37.5% de xylose et des traces de rhamnose et en plus la présence l'acide galacturonique, galactose, arabinose qui sont des facteurs très importants dans l'activité anti complément.

Deux fractions PM1 et PMII des polysaccharides acides isolées des feuilles de *Plantago major* ayant une activité anti complément relativement élevée. PM1 est une pectine anionique peut être utilisée comme control positive (Samuelsen et al, 1998) parce que les polysaccharides poly anionique présentent une forte activité sur l'inhibition de la voie alterne du complément (Yu et al, 2005).

A cet effet, l'activité anti complément de l'hétéroxylane extrait a partir des graines de *Plantago notata* est due à la présence de l'acide galacturonique, arabinose, galactose mais le pourcentage de l'acide glucuronique a présenté un effet néfaste sur l'activité anti complément en réduisant le taux d'inhibition ce qui explique le taux d'inhibition relativement faible de cet hétéroxylane en comparaison a celle de l'héparine. Pour améliorer notre résultat on peut utiliser d'autres gamme des dilutions avec des concentrations élevées puisque l'activité anti complément augmente avec l'augmentation de la concentration (Wang et al, 2008).

Notant que des études antérieures de l'activité anti complément des polysaccharides ont été effectuées dans un milieu liquide par la technique AP50 dont le même principe qui est de déterminer la concentration de polysaccharide qui entraîne l'inhibition de 50% de l'hémolyse. (Xu et al, 2007) ont montré que l'héparine et le polysaccharide a une concentration de 88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 81 $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivement capables d'inhiber 50% d'hémolyse en milieu liquide. (Chen et al, 2016) ont montré que l'héparine et les polysaccharides a une concentration 43 $\mu\text{g}/\text{ml}$  et 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivement capables d'inhiber 50 % de la lyse.

## *Conclusion et Perspectives*

## Conclusion

Le complément est un système complexe, son rôle est primordial dans la défense immunitaire innée. L'implication du complément dans la régulation et la synchronisation du processus inflammatoire demeure bénéfique pour l'hôte puisqu'elle vise à éliminer les organismes pathogènes et les cellules de l'hôte qui sont endommagées. Mais lorsqu'il est actif d'une manière inappropriée ou excessive, il peut contribuer au développement de diverses maladies auto immunes ou inflammatoires.

Dans ce contexte, la présente étude recherche de la capacité immuno modulatrice que peuvent avoir les polysaccharides ; qui ont attiré beaucoup d'attention en raison de leurs activités anti inflammatoire et anti complément puissantes ; contre la première ligne de l'immunité innée, le système de complément qui est exprimée par l'inhibition de leur activité via la voie alterne en utilisant le test AP100, et par la suite de contribuer à valoriser les substances naturelles d'origine végétale issus des plantes spontanées à caractère médicinal à savoir *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) et d'élargir la gamme de leurs utilisation dans le domaine de la médecine moderne.

Les résultats de cette étude de l'activité anti complément des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles (hétéroxylane) extraits des graines de *Plantago notata* Lagasca ont montré une efficacité notable vis à vis l'inhibition de la voie alterne du complément après l'exploration de la technique hémolytique AP100. Où des boites Pétri contenant le gel d'agarose et les érythrocytes ont été utilisées pour étudier ; *in vitro* ; le pouvoir inhibiteur ; de la lyse des hématies provoquée par le complément ; des fractions oligosaccharidiques de l'hétéroxylane et de l'héparine. L'hétéroxylane de *Plantago notata* a donné un taux d'inhibition important de l'ordre de 64.64% a une concentration de 1000µg/ml, en comparaison avec l'héparine et des études réalisées précédemment on peut conclure que l'activité anti complément de l'hétéroxylane de *Plantago notata* est importante.

On arrive que les fractions oligosaccharidiques étudiées possèdent ce pouvoir inhibiteur de la voie alterne du complément d'une manière dose dépendante, et cela est due à la structure de l'hétéroxylane qui contient le xylose, l'arabinose et aussi l'acide galacturonique qui sont des facteurs très important de l'activité anti complément. Donc, l'activité anti-complément de l'hétéroxylane isolés de *Plantago notata* pourrait justifier leur utilisation dans la médecine traditionnelle comme un anti inflammatoire. Aussi la propriété anti-complément de l'hétéroxylane lui permet de combler le manque des traitements pharmacologiques des maladies due a l'hyper activation de système du complément via a la voie alterne et pourquoi pas remplacer des principes actifs des médicaments anti inflammatoires comme l'éculizumab.

Au terme de notre étude nous espérons, avec nos résultats, avoir participé à la valorisation de la médecine traditionnelle pour parvenir à la disponibilité de médicaments à base de plantes médicinales efficaces et accessibles pour les traitements anti-inflammatoires.

A travers cette investigation, nous avons apporté de nouvelles données préliminaires importantes concernant les propriétés anti complément des polysaccharides extraits de graines de *Plantago notata*. Donc, il est nécessaire d'approfondir les études complémentaires pour mieux comprendre et expliquer le mécanisme d'action de ces bio molécules comme la détermination du mécanisme d'inhibition du complément en expliquant la manière d'interaction des hétéroxyanes avec le cascade hémolytique du complément.



## *Références Bibliographiques*

**Références bibliographiques**

- Abuaf N**, Adotévi O, Amé-Thomas P, André C, Arnulf B, Aucouturier P, Aufran B, Bahram S, Baron C, Batteux F. 2018. Immunologie fondamentale et immunopathologie: Enseignements thématique et intégré-Tissu lymphoïde et sanguin/Immunopathologie et immuno-intervention: Elsevier Health Sciences.
- Angioi A**, Fervenza FC, Sethi S, Zhang Y, Smith RJ, Murray D, Van Praet J, Pani A, De Vriese AS. 2016. Diagnosis of complement alternative pathway disorders. *Kidney international* 89(2):278-288.
- Athukorala Y**, Jung W-K, Vasanthan T, Jeon Y-J. 2006. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers* 66(2):184-191.
- Benaoun F**, Delattre C, Boual Z, Ursu AV, Vial C, Gardarin C, Wadouachi A, Le Cerf D, Varacavoudin T, El-Hadj MDO. 2017. Structural characterization et rheological behavior of a heteroxylan extracted from *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) seeds. *Carbohydrate polymers* 175:96-104.
- Blondin C**, Fischer E, Boisson-Vidal C, Kazatchkine MD, Jozefonvicz J. 1994. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. *Molecular immunology* 31(4):247-253.
- Boual Z**, Chouana T, Kemassi A, Hamid Oudjana A, Daddi Bouhoun M, Michaud P, Ould El Hadj M. 2015. Chemical composition et bioactivité of water-soluble polysaccharides from leaves of *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae).
- Boual Z**, Kemassi A, Khelil AOEH, Michaud P, El Hadj MDO. Partial characterization of water soluble polysaccharides extracted from one saharian medicinal plant: *Malva aegyptiaca* L; 2011. p 420-424.
- Carroll MC**. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature immunology* 5(10):981-986.
- CAUBET J**, VERMEULEN C, HAUSER C. 2003. «Vrais» et «faux» angioedèmes: Allergo-immunologie. *Médecine et hygiène* 61(2433):799-802.
- Chen M**, Wu J, Shi S, Chen Y, Wang H, Fan H, Wang S. 2016. Structure analysis of a heteropolysaccharide from *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. et anticomplementary activity of its sulfated derivatives. *Carbohydrate polymers* 152:241-252.
- Chen R**, Meng F, Liu Z, Chen R, Zhang M. 2010. Antitumor activities of different fractions of polysaccharide purified from *Ornithogalum caudatum* Ait. *Carbohydrate Polymers* 80(3):845-851.
- Chung I-M**, Kim E-H, Kim J-J, Moon H-I. 2011. Inhibition effects of the classical pathway complement of isolated compounds from *Quercus glauca*. *Human & experimental toxicology* 30(9):1415-1419.

- Daugan M**, Noe R, Fridman H, Sautes-Fridman C, Roumenina LT. 2017a. The complement system: a double edge sword in tumor progression. *Medecine Sciences: M/S* 33(10):871-877.
- Daugan M**, Noe R, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Roumenina LT. 2017b. Le système du complément-Une épée à double tranchant dans la progression tumorale. *médecine/sciences* 33(10):871-877.
- Diallo D**, Paulsen BS, Liljebäck TH, Michaelsen TE. 2001. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology* 74(2):159-171.
- Dragon-Durey M-A**, Fremeaux-Bacchi V. 2006. Déficiences en protéines du complément en pathologie humaine. *La Presse Médicale* 35(5):861-870.
- Du D, Lu Y**, Cheng Z, Chen D. 2016. Structure characterization of two novel polysaccharides isolated from the spikes of *Prunella vulgaris* et their anticomplement activities. *Journal of ethnopharmacology* 193:345-353.
- Frémeaux-Bacchi V**, Blouin J, Weiss L. 1994. Exploration of the complement system in clinical practice. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 1(1):71-77.
- Frémeaux-Bacchi V**, Ngo S, Bordereau P, Poulain N, Roncelin S, Blouin J, Roumenina LT, Dragon-Durey M-A. 2012a. Exploration du complément : actualités 2012. *Revue Francophone des Laboratoires* 2012(444):31-37.
- Frémeaux-Bacchi V**, Ngo S, Bordereau P, Poulain N, Roncelin S, Blouin J, Roumenina LT, Dragon-Durey M-A. 2012b. Exploration du complément: actualités 2012. *Revue Francophone des Laboratoires* 2012(444):31-37.
- Gao H-w**, Zhang M-m, Liu Y-l, Xu Q-m, Yang S-l. 2013. Anticomplement activity of ginsenosides from *Panax ginseng*. *Journal of Functional Foods* 5(1):498-502.
- Garcia-Laorden MI**, Sole-Violan J, de Castro FR, Aspa J, Briones ML, Garcia-Saavedra A, Rajas O, Blanquer J, Caballero-Hidalgo A, Marcos-Ramos JA. 2008. Mannose-binding lectin et mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, et outcome of pneumonia in adults. *Journal of Allergy et Clinical Immunology* 122(2):368-374. e362.
- Gasque P**, Legoedec J, Thomas A, Sumereau E, Schouft M, Chan P, Fontaine M. 1996. Nouvelles fonctions pour le système du complément. Apport de l'étude des synthèses locales.
- Gupta P**, Tripathy AS. 2020. Alternative pathway of complement activation has a beneficial role against Chandipura virus infection. *Medical microbiology and immunology* 209(2):109-124.

- Heitzeneder S, Seidel M, Förster-Waldl E, Heitger A. 2012. Mannan-binding lectin deficiency—Good news, bad news, doesn't matter? *Clinical immunology* 143(1):22-38.
- Hogwood J, Pitchford S, Mulloy B, Page C, Gray E. 2020. Heparin and non-anticoagulant heparin attenuate histone-induced inflammatory responses in whole blood. *Plos one* 15(5):e0233644.
- Hromádková Z, Paulsen BS, Polovka M, Košťálová Z, Ebringerová A. 2013. Structural features of two heteroxylan polysaccharide fractions from wheat bran with anti-complementary and antioxidant activities. *Carbohydrate polymers* 93(1):22-30.
- Huo J, Lu Y, Jiao Y, Chen D. 2020a. Structural characterization and anticomplement activity of an acidic polysaccharide from *Hedyotis diffusa*. *International journal of biological macromolecules* 155:1553-1560.
- Huo J, Lu Y, Xia L, Chen D. 2020b. Structural characterization and anticomplement activities of three acidic homogeneous polysaccharides from *Artemisia annua*. *Journal of ethnopharmacology* 247:112281.
- Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. 2001. Pathogens have evolved various means of evading or subverting normal host defenses. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 5th edition: Garland Science.
- Jeong S-C, Cho S-P, Yang B-K, Gu Y-A, Jang J-H, Huh T-L, Song C-H. 2004. Production of an anti-complement exo-polymer produced by *Auricularia auricula-judae* in submerged culture. *Biotechnology Letters* 26(11):923-927.
- Jin W, Fang Q, Jiang D, Li T, Wei B, Sun J, Zhang W, Zhang Z, Zhang F, Linhardt RJ. 2020. Structural characteristics and anti-complement activities of polysaccharides from *Sargassum hemiphyllum*. *Glycoconjugate Journal* 37(5):553-563.
- Jin W, Zhang W, Liang H, Zhang Q. 2016. The structure-activity relationship between marine algae polysaccharides and anti-complement activity. *Marine drugs* 14(1):3.
- Jönsson G, Truedsson L, Sturfelt G, Oxelius V-A, Braconier JH, Sjöholm AG. 2005. Hereditary C2 deficiency in Sweden: frequent occurrence of invasive infection, atherosclerosis, and rheumatic disease. *Medicine* 84(1):23-34.
- Kerboua KE, Djenouhat K. 2020. Semi-solid phase assay for the alternative complement pathway activity assessment (AP100). *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 41(2):144-151.
- Kulasekararaj AG, Hill A, Rottinghaus ST, Langemeijer S, Wells R, Gonzalez-Fernandez FA, Gaya A, Lee JW, Gutierrez EO, Piatek CI. 2019. Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study. *Blood* 133(6):540-549.
- Kulkarni PA, Afshar-Kharghan V. 2008. Anticomplement therapy. *Biologics: targets & therapy* 2(4):671.

- Lee SJ, Lee HS, Kim SY, Shin K-S. 2018. Immunostimulatory and anti-metastatic activity of polysaccharides isolated from byproducts of the corn starch industry. *Carbohydrate polymers* 181:911-917.
- Lee SM, Kim JH, Zhang Y, An RB, Min BS, Hyouk J, Kyu LH. 2003. Anti-complementary activity of protostane-type triterpenes from *Alismatis rhizoma*. *Archives of pharmacal research* 26(6):463-465.
- Ling M, Piddlesden S, Morgan B. 1995. A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in the classical and alternative pathways of complement. *Clinical & Experimental Immunology* 102(3):582-588.
- Liu H, Wang J, Zhang Q, Zhang H. 2018. The effect of different substitute groups and molecular weights of fucoidan on neuroprotective and anticomplement activity. *International journal of biological macromolecules* 113:82-89.
- Longhurst H, Cicardi M. 2012. Hereditary angio-oedema. *The Lancet* 379(9814):474-481.
- Médaille C, Briend-Marchal A, Braun J-P. 2005. Prélèvement sanguin. *EMC-Vétérinaire* 2(1):1-13.
- Merle NS, Church SE, Fremaux-Bacchi V, Roumenina LT. 2015. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in Immunology* 6(262).
- Michaël L, Régis Peffault de L, Gérard S. 2013. L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Hématologie* 19(5):319-330.
- Michaelsen T, Gilje A, Samuelsen A, Høgåsen K, Paulsen B. 2000. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology* 52(5):483-490.
- Morgan BP. 2000. The complement system: an overview. *Complement methods and protocols*:1-13.
- Mu LH, Zhao JY, Liu P. 2016. Anticomplement cycloartane triterpene glycosides from *Beesia calthaefolia* (Maxim.). *Phytochemistry Letters* 16:47-51.
- Nesargikar P, Spiller B, Chavez R. 2012a. The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2(2):103.
- Nesargikar P, Spiller B, Chavez R. 2012b. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2(2):103-111.
- Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation; 2013. Elsevier. p 479-492.
- North J, Whaley K. 2001. Complement: measurement. e LS.
- Oprea L. 2006. Recherche de nouveaux marqueurs de mort programmée (apoptose) dans les membranes des hématies humaines sénescents: impact en transfusion sanguine: Lille 1.

- Puissochet S. 2016. Rôles des défenses immunitaires associées au système du complément dans les pathologies buccales: Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Ren Q, Chen J, Ding Y, Cheng J, Yang S, Ding Z, Dai Q, Ding Z. 2019. In vitro antioxidant and immunostimulating activities of polysaccharides from Ginkgo biloba leaves. *International journal of biological macromolecules* 124:972-980.
- Rosain J, Ngo S, Bordereau P, Poulain N, Roncelin S, Martins PV, Dragon-Durey M-A, Frémeaux-Bacchi V. Complement deficiencies and human diseases; 2014a. p 271-280.
- Rosain J, Ngo S, Bordereau P, Poulain N, Roncelin S, Martins PV, Dragon-Durey M-A, Frémeaux-Bacchi V. Déficits en protéines du complément et pathologies humaines; 2014b. p 271-280.
- Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, Bell L. 2007. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nature biotechnology* 25(11):1256-1264.
- Sadallah S, Schifferli JA. 2018. Complement in diseases. *Revue medicale suisse* 14(601):752-756.
- Samuelsen A. 2000. Structural features of biologically active polysaccharide fractions from the leaves and seeds of *Plantago major* L. *Bioactive carbohydrate polymers*: Springer. p 37-46.
- Samuelsen AB, Paulsen BS, Wold JK, Knutsen SH, Yamada H. 1998. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. *Carbohydrate polymers* 35(3-4):145-153.
- Sarma JV, Ward PA. 2011. The complement system. *Cell and tissue research* 343(1):227-235.
- Schejbel L, Skattum L, Hagelberg S, Åhlin A, Schiller B, Berg S, Genel F, Truedsson L, Garred P. 2011. Molecular basis of hereditary C1q deficiency—revisited: identification of several novel disease-causing mutations. *Genes & Immunity* 12(8):626-634.
- Selander B, Mårtensson U, Weintraub A, Holmström E, Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Truedsson L, Sjöholm AG. 2006. Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *The Journal of clinical investigation* 116(5):1425-1434.
- Seo HW, Hung TM, Na M, Jung HJ, Kim JC, Choi JS, Kim JH, Lee H-K, Lee I, Bae K. 2009. Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. *Archives of Pharmacal Research* 32(11):1573-1579.
- Servais G, Walmagh J, Duchateau J. 1991. Simple quantitative haemolytic microassay for determination of complement alternative pathway activation (AP50). *Journal of immunological methods* 140(1):93-100.
- Shi L. 2016. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International journal of biological macromolecules* 92:37-48.

- Singh A.** 2015. Immunology and Medical Microbiology. Kalyani Publishers, New Delhi.
- Stern RM,** Connell NT. 2019. Ravulizumab: a novel C5 inhibitor for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Therapeutic advances in hematology* 10:2040620719874728.
- Talarico L,** Pujol C, Zibetti R, Faria P, Nosedà M, Duarte M, Damonte E. 2005. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral research* 66(2-3):103-110.
- Tong H,** Liang Z, Wang G. 2008. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. *Carbohydrate polymers* 71(2):316-323.
- Truedsson L,** Bengtsson AA, Sturfelt G. 2007. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40(8):560-566.
- Valenzuela JG,** Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM. 2000. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* 275(25):18717-18723.
- Voisin A.** 1875. Des injections de sang de mouton dans le tissu cellulaire de l'homme. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* 10(1):543-546.
- Wang L,** Zhang H, Zhang X, Chen Z. 2008. Purification and identification of a novel heteropolysaccharide RBPS2a with anti-complementary activity from defatted rice bran. *Food chemistry* 110(1):150-155.
- Wang S,** Shi S, Lian H, Zhu C, Wang H, Liu R, Bligh S. 2016. Structural Features and Anti-Complement Activity of an Acidic Polysaccharide from *Forsythia suspensa*. *J Glycom Lipidom* 2:1-8.
- Weiler JM,** Edens RE, Linhardt R, Kapelanski D. 1992. Heparin and modified heparin inhibit complement activation in vivo. *The Journal of Immunology* 148(10):3210-3215.
- Wen Q,** Jin X, Lu Y, Chen D-F. 2020. Anticomplement ent-labdane diterpenoids from the aerial parts of *Andrographis paniculata*. *Fitoterapia* 142:104528.
- Wen Q,** Lu Y, Chao Z, Chen D-f. 2017. Anticomplement triterpenoids from the roots of *Ilex asprella*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 27(4):880-886.
- Willrich MA,** Ladwig PM, Martinez MA, Sridharan MR, Go RS, Murray DL, Microangiopathy CAPT, at the Mayo DOG. 2021. Monitoring Ravulizumab effect on complement assays. *Journal of Immunological Methods* 490:112944.
- Wong EK,** Kavanagh D. 2015. Anticomplement C5 therapy with eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome. *Translational Research* 165(2):306-320.
- Wong EK,** Kavanagh D. Diseases of complement dysregulation—an overview; 2018. Springer. p 49-64.

- Wu Y, Cui SW, Tang J, Wang Q, Gu X. 2007. Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. *Carbohydrate polymers* 70(4):437-443.
- Xi Z, Chen W, Wu Z, Wang Y, Zeng P, Zhao G, Li X, Sun L. 2012. Anti-complementary activity of flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don. *Food chemistry* 130(1):165-170.
- Xia L, Li B, Lu Y, Chen D. 2019. Structural characterization and anticomplement activity of an acidic polysaccharide containing 3-O-methyl galactose from *Juniperus tibetica*. *International journal of biological macromolecules* 132:1244-1251.
- Xia L, Zhu M, Chen D, Lu Y. 2020. *Juniperus pingii* var. *wilsonii* acidic polysaccharide: Extraction, characterization and anticomplement activity. *Carbohydrate polymers* 231:115728.
- 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* 7(2):175-182.
- Young M., Alders R., Grimes S., Spradbrow P., Dias P., da Silva A. et Lobo Q. 2012. *Le Contrôle de la Maladie de Newcastle chez les poulets de village: un manuel de laboratoire*. 2e éd. Monographie ACIAR No. 87a. Centre Australien International pour la Recherche Agricole: Canberra. 153 p.
- Yu H, Muñoz EM, Edens RE, Linhardt RJ. 2005. Heparin regulation of the complement system. *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*: Elsevier. p 313-343.
- Zhang W, Jin W, Sun D, Zhao L, Wang J, Duan D, Zhang Q. 2015. Structural analysis and anti-complement activity of polysaccharides from *Kjellmaniella crsaaifolia*. *Marine drugs* 13(3):1360-1374.
- Zhang W, Wang J, Jin W, Zhang Q. 2013. The antioxidant activities and neuroprotective effect of polysaccharides from the starfish *Asterias rollestoni*. *Carbohydrate polymers* 95(1):9-15.
- Zhang Y, Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H. 1997. Fractionation and chemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of *Dipsacus asperoides*. *Planta medica* 63(05):393-399.
- Zheng H-c, Lu Y, Chen D-f. 2018. Anticomplement compounds from *Polygonum chinense*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 28(9):1495-1500.
- Zipfel PF, Mihlan M, Skerka C. 2007. The alternative pathway of complement: a pattern recognition system. *Current topics in innate immunity*:80-92.
- Zuber J, Fakhouri F, Roumenina LT, Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. 2012. Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nature Reviews Nephrology* 8(11):643.



# *Annexes*

## Annexes

Répétition 1		Moyenne de diamètre (D)	Rayon (r)	Surface de la lyse	Pourcentage de la lyse %	Pourcentage d'inhibition %
Contrôle négatif		1.6	0.8	2.001	100	0
Contrôle positif		1.1	0.55	0.9499	47.47	52.53
Oligosaccharides µg/ml	200	1.5	0.75	1.7663	88.27	11.73
	400	1.45	0.725	1.6505	82.48	17.73
	600	1.25	0.625	1.2266	61.3	38.7
	800	1.2	0.6	1.1304	56.5	43.5
	1000	1.05	0.525	0.8655	43.25	56.57

Contrôle négatif		1.85	0.925	2.6866	100	0
Contrôle positif		0.95	0.475	0.7085	26.37	73.63
Oligosaccharides µg/ml	200	1.4	0.7	1.5386	57.27	42.73
	400	1.35	0.675	1.4307	53.25	46.75
	600	1.3	0.65	1.3267	49.38	50.62
	800	1.15	0.575	1.0382	38.64	61.36
	1000	1.1	0.55	0.95	35.36	64.64

Contrôle négatif		1.45	0.725	1.6505	100	0
Contrôle positif		1.05	0.525	0.8655	52.44	47.56
Oligosaccharides µg/ml	200	1.35	1.4307	1.4307	86.68	13.32
	400	1.3	1.3227	1.3227	80.13	19.87
	600	1.3		1.3227	80.13	19.87
	800	1.2	1.1304	1.1304	68.49	31.51
	1000	1.1	0.95	0.95	35.36	64.64

## Résumé

Les polysaccharides extraits à partir des plantes médicinales ayant des diverses activités biologiques telles que des activités anti-inflammatoires, antioxydant, et également l'activité anti-complément qui est l'objectif de cette étude. Le présent travail est consacré à l'étude de l'activité anti-complément des polysaccharides hydrosolubles (hétéroxylane) issus de graines du *Plantago notata* Lagasca ; est une plante spontanée à caractère médicinal de famille (Plantaginaceae) ; récoltée dans la région de Ghardaïa, le test AP100 consiste à mesurer le taux d'inhibition de la voie alterne du complément par des fragments oligosaccharidiques de l'hétéroxylane et de déterminer la concentration qui donne 100 % d'inhibition. Cette étude est effectuée dans des boîtes d'agarose-érythrocytes où on a préparé des séries des dilutions des fractions oligosaccharidiques avec une dilution 1:6 de sérum humain normale comme contrôle négatif et une concentration de 1000 $\mu$ /ml de l'héparine qui est un polysaccharide sulfaté utilisé comme contrôle positif, l'activité anti-complément de l'hétéroxylane est comparée à celle de l'héparine où l'hétéroxylane à une concentration 1000 $\mu$ /ml donne un taux d'inhibition 64,64% qui est proche à celle de l'héparine 73,63% avec la même concentration. Ces résultats sont comparés avec des études antérieures qui ont montré que les hétéroxylanes ayant une puissante activité anti-complément donc on peut conclure que ce polysaccharide peut être utilisé comme inhibiteur thérapeutique pertinent de la voie alterne du complément.

**Mots clés :** *Plantago notata* Lagasca , Hétéroxylane , Anti-complément, Technique AP100 , Voie alterne, Oligosaccharides

## Summary

Polysaccharides extracted from medicinal plants having various biological activities such as anti-inflammatory activities, antioxidant, and also anti complement activity which is the objective of this study. This work is devoted to the study of the anti-complementing activity of water soluble polysaccharides (heteroxylan) derived from seeds of *Plantago notata* Lagasca; is a spontaneous plant with medicinal family character (Plantaginaceae); harvested in the region of Ghardaïa, the AP100 test consists of measuring the rate of inhibition of the alternating complement pathway by oligosaccharidic fragments of heteroxylane and determining the concentration that gives 100 % inhibition. This study is carried out in agarose-erythrocyte boxes where in cases of agarose erythrocytes where series of dilutions of oligosaccharidic fractions have been prepared with dilution 1:6 normal human serum as negative control and a concentration of 1000 $\mu$ /ml of heparin which is a sulphate polysaccharide used as positive control, The anti complement activity of heteroxylan is compared with that of heparin where heteroxylan has a concentration of 1000 $\mu$ /ml gives an inhibition rate 64.64% which is close to that of heparin 73.63% with the same concentration. These results are compared with previous studies that have shown that heteroxylans with strong anti complement activity so it is possible to conclude that this polysaccharide can be used as a relevant therapeutic inhibitor of the alternate pathway.

**Key words:** *Plantago notata* Lagasca , Heteroxylan , Anti-complement , AP100 technique , Alternative pathway, Oligosaccharides.

السكريات المستخرجة من النباتات الطبية لها أنشطة بيولوجية مختلفة مثل النشاط المضاد للالتهابات ومضادات الأكسدة وكذلك النشاط المضاد للمتومات. يركز عملنا على دراسة تثبيط نشاط المتمم بواسطة السكريات القابلة للذوبان في الماء (heteroxylan) المستخلصة من نبتة بذور لسان الحمل *Plantago notata lagasca*، وهي نبتة تلقائية ذات ميزة طبية من عائلة (Plantaginaceae)، في منطقة Ghardaïa، يعتمد اختبار AP100 على قياس معدل تثبيط مسار المتمم بواسطة أجزاء من heteroxylan وتحديد تركيزه الذي يعطي تثبيط بنسبة 100٪. أجريت هذه الدراسة في علب pétrie تحتوي على هلام agarose و كريات الدم الحمراء حيث تم تحضير سلسلة من التخفيفات لأجزاء من heteroxylane و تخفيف بنسبة 6:1 من المصل البشري الطبيعي ألا وهو الاختبار السلبي وتركيز 1000 ميكروغرام / مل من héparine ، وهو متعدد السكريات الكبريتية المستخدمة كاختبار إيجابي ؛ تمت مقارنة تثبيط نشاط المتمم لل heteroxylane مع نشاط تثبيط héparine ، heteroxylan بتركيز 1000 ميكروغرام / مل يعطي معدل تثبيط يعادل 64.64٪ وهو قريب من معدل تثبيط 73.63٪ في نفس التركيز ؛ تمت مقارنة هذه النتائج مع الدراسات السابقة التي أظهرت أن heteroxylan له نشاط مهم مضاد للمتمم ، ويمكن القول ان heteroxylan يمكن استخدامه كمثبط للمتمم.

الكلمات المفتاحية: *Plantago notata Lagasca*، Heteroxylane، مضاد للمتمم، تقنية AP100،  
Oligosaccharides.