

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 :

BELABBAS Raouane et BOUAZZA Imane

**Contribution à l'étude du potentiel biologique de l'extrait de
polysaccharides issu d'une plante de la famille de
Liliaceae.**

Soutenu publiquement

Le : 19/06/2022

Devant le jury :

Président	OULD EL HADJ KHELLIL Aminata	Pr	Univ. Ouargla
Encadreur	BENAOUN Fatima	MCB	Univ. Ouargla
Co-Encadreur	BOUAL Zakaria	Pr	Univ. Ouargla
Examineur	SAYAH Zineb	MCA	Univ. Ouargla

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier **Dieu** de nous avoir donné le courage pour achever cette étude.

Nos vifs remerciements s'adressent particulièrement notre encadrant **M^{lle}. 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 ses précieux conseils tout au long de la réalisation et l'élaboration de ce travail.

Nous voudrions remercier **M^r. 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 durant ce travail.

Nous tenons à remercier les membres du jury :

M^{me} OULD EL HADJ KHELIL Aminata, 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.

M^{me} SAYAH Zineb, 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 notre travail.

Nous remercions **le Laboratoire de Protection des Écosystèmes en Zones Arides et Semi Arides**, en particulier son Directeur, **M^r 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 aussi tous les enseignants du département de biologie faculté des Sciences de Nature et de Vie de l'Université de ouargla et nous remercions tous ceux et celles, qui ont à la réalisation de ce travail.

Dédicace



Je dédie ce travail

A mes chers parents Laid et Fatima, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études

A mes chères sœurs Zaineb, Salima et Soraya pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral

A mes chers frères, Salah, Toufik, Hamid et AbdRaouf pour leur appui et leur encouragement.

A mes cousines Nana Nor, Soumaia Khawla et Nergis

A mes amis Khadidja, Safa, Chaima, Yasmine, Rima, Aya, Nesrine, Ibtissam, Lamia, Rahma Et ma binôme Iman

A toute la famille BELABBAS.

A tous les étudiants de la promotion Master II Biochimie Appliquée (2021/2022).

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et contribué à la réalisation de ce mémoire.

Raouane

Dédicace



Je dédie ce travail

A mes chers parents Boubakar et Khadra, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chères sœurs Asma, Hakima, Amal et Fatima pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral

A mes chers frères, Abdoet Mohamed pour leur appui et leur encouragement

A mes amis SafaChaimaYassmine Rima Aya Nesrine Et ma binôme Rawane

A toute la famille BOUAZZA.

*A tous les étudiants de la promotion Master II Biochimie Appliquée
(2021/2022)*

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et contribué à la réalisation de ce mémoire.

Imane

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Tableau de matière	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	IV
Abréviations	VI
Introduction	1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.- Système du complément	4
I.1.- Généralités	4
I.2.- Fonctionnement	4
I.2.1.- Voie classique	4
I.2.2.- Voie alterne	5
I.2.3.- Voie de lectine	6
I.2.4.- Voie finale	7
I.3.- Rôles	8
I.3.1.- Opsonisation	8
I.3.2.- Rôle pro-inflammatoire	8
I.3.3.- Lyse des pathogènes	9
I.4.- Régulation et activation inappropriée	9
I.4.1.- Régulation du complément	9
I.4.2.- Activation inappropriée du complément	11
I.5.- Traitements anti-complément	12
I.5.1.- Eculizumab	12
I.5.2.- Ravulizumab	12
II.- <i>Urginea noctiflora</i>	12
II.1.-Présentation, classification taxonomique et utilisation	12
II.2.- Polysaccharides du genre <i>Urginea</i>	14
III.- Effets immuno-modulatrices des polysaccharides	15
III.1.- Effet anti-inflammatoire	15
III.2.- Effet anti-tumorale	15
III.3.- Effet anti-complément	16

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1.- Matériel d'étude	20
II.1.1.- Produits chimiques	20
II.1.1.1.- Tampons	20

II.1.1.1.1.- Tampon ACP (pH : 7,4)	20
II.1.1.1.2.- Tampon PBS (pH :7,4)	20
II.1.2.- Matériel biologique	24
II.1.2.1.- Polysaccharides hydrosolubles	24
II.1.2.2.- Hydrolyse des liaisons Osidiques	24
II.1.2.3.- Le sang	24
II.2.- Méthodologie d'étude du test AP100	24
II.2.1.- Hématies et sérum	25
II.2.2.- Solution mère et dilution des oligosaccharides et de l'héparine	24
II.2.3.- Boites d'AP100 (Gel d'agarose et érythrocytes)	24
II.2.4.- Test anti-complément AP100	27
II.2.4.1.- Pré-incubation	27
II.2.4.2.- Incubation	27
II.2.5.- Expression des résultats	31
II.2.5.1.- Surface d'hémolyse	31
II.2.5.2.- Pourcentage d'hémolyse	31
II.2.5.3.- Taux d'inhibitions	31

Chapitre III : Résultats et discussion

III.- Inhibition de la voie alterne par les oligosaccharides (AP100)	33
Conclusion	38
Références bibliographiques	40
Annexes	50

Liste des figures

Figures	Noms des figures	Pages
Figure 1	Activation de la voie classique.	5
Figure 2	Activation de la voie alterne du complément.	6
Figure 3	Activation de la voie associée aux lectines du complément.	7
Figure 4	Voie finale commune.	8
Figure 5	Régulation d'activation de système du complément.	9
Figure 6	<i>Urginea noctiflora</i> .	13
Figure 7	Schéma de différentes étapes de préparation des boite AP100.	28
Figure 8	Schéma de différentes étapes de test AP100.	29
Figure 9	Histogramme représente les pourcentages de l'inhibition de l'hémolyse en présence des oligosaccharides d' <i>Urginea noctiflora</i> et l'héparine.	33
Figure 10	Test AP100 ; Inhibition de la lyse des hématies par l'activation de la voie alterne du complément par les oligosaccharides d' <i>Urginea noctiflora</i> Batt & Trab et et l'héparine.	34

Liste des tableaux

Tableaux	Noms des tableaux	Page
Tableau 1	Protéines régulatrice du complément.	10
Tableau 2	Pathologies associées de déficiences en protéines du complément.	11
Tableau 3	Effets pharmacologiques et composition de plusieurs extraits issus de quelques espèces du genre <i>Urginea</i> .	14
Tableau 4	Activité anti-complément des polysaccharides.	17
Tableau 5	Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation.	21
Tableau 6	Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation.	22
Tableau 7	Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation.	23
Tableau 8	Méthode de dilution des oligosaccharides d' <i>Urginea noctiflora</i> Batt & Trab (Liliaceae).	26
Tableau 9	Position systématique et usages thérapeutiques de la plante <i>Urginea noctiflora</i> Batt & Trab (Liliaceae).	26
Tableau 10	Test anti complément AP100 (7 puits pour chaque boîte Pétri).	30

Abréviations

A	L
ACP: Alternative Complement Pathway	LES: Lupus érythémateux systémique
C	M
CAM: Complexe d'attaque membranaire	MASP: Mannan-binding serine proteases
D	MASP-1: Mannan-binding serine proteases de type 1
DAF: Facteur d'accélération de décroissance	MASP-2: Mannan-binding serine proteases de type2
E	MASP-3: Mannan-binding serine proteases de type3
EGTA: Ethylène glycol-bis [-aminoéthyléther] N,N'-tétraacétique	MBL: Mannan-binding lectin
F	MCP: Protéine de cofacteur membranaire
Facteur P : Properdine	MgCl₂ 6H₂O : Chlorure de magnésium hydrate
Fc: Fraction cristallisable de l'anticorps	N
G	Na₂HPO₄: D'Hydrogénophosphate disodique anhydre Na ₂ HPO ₄
GAG: Glycosaminoglycanes	NaCl: Chlorure de sodium
GlcA : Acide galacturonique	P
H	PBS: Solution saline tamponnée de phosphate
HANE : (Edèmeangioneurotique héréditaire	S
HPN: Hémoglobinurie paroxystique nocturne	SHN : Sérum humain normal
HRF : Facteur de restriction homologue	SHU: Syndrome hémolytique et urémique
I	T
IgG: Immunoglobuline de classe G	TFA : Acide tri-fluoro-acétique
IgM : Immunoglobuline de classe M	
K	
KCl : Chlorure de potassium	
KH₂PO₄: Dihydrogénophosphate de potassium anhydre	

Introduction

Introduction

Le système du complément est l'un des premiers mécanismes de défense après l'entrée de l'agent pathogène (Wilmet, 1970). Le complément a longtemps été considéré comme un élément mineur du système immunitaire. Mais à partir des années 1974, de nombreuses expériences, dont certaines réalisées à l'aide d'animaux dépourvus des protéines du complément, ont démontré une interrelation étroite entre tous les systèmes de défense (Pepis, 1974). Le système du complément est composé de plus d'une trentaine de protéines sériques et membranaires, activatrices et régulatrices, interagissant entre elles de façon régulée (Walport, 2001). Il joue un rôle essentiel dans les mécanismes de défense immunitaire (Halbwachs-Mecarelli et al., 1986). On distingue trois voies d'activation la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne (Dragon-Durey, 2006).

La famille des Liliaceae est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs (Twentyman, et Ffhom, 1984). C'est une grande famille répartie partout dans le monde, mais surtout abondante et diversifiée dans les régions sèches, tempérées à subtropicales. La plupart des espèces de cette famille sont toxiques pour le bétail, mais il existe de nombreuses espèces de cette famille qui ont des propriétés médicinales (Afroz et Hassan, 2008). *Urginea noctiflora* est une espèce de la famille de liliaceae, elle est endémique du Sahara septentrional où sa distribution est commune. L'on retrouve aussi dans le Tademaït et sur les Hamadas l'Oranais et le sud Marocain (Ozenda, 1977). Il a été rapporté que les glycosides de cette plante peuvent être impliqués dans des propriétés médicinales diverses (Azizi et al., 2016).

Les polysaccharides sont des macromolécules complexes que l'on retrouve dans tous les règnes végétal, animal et bactérien (Delbarre et al., 2014). Ils sont composés d'enchaînements d'unités osidiques reliées par des liaisons glycosidiques (Dimopoulou, 2013). Les propriétés physico-chimiques des polysaccharides dépendent à la fois de leur masse molaire, de leur composition chimique, et enfin de la structure, avec la présence ou non de substituants, de leur position et des branchements. Grâce à leur diversité de structures quasi infinie, chaque polysaccharide caractérisé par son unité répétitive est unique et offre ainsi des propriétés fonctionnelles qui lui sont spécifiques (Delbarre et al., 2014). Ils sont les macromolécules les plus abondantes sur la terre et dans les océans (Théo et al., 2008). Les polysaccharides ne sont pas seulement utilisés comme réserves énergétiques par les êtres vivants, mais aussi pour assurer de nombreuses fonctions biologiques (Yang et al., 2009). Ils sont connus et exploités depuis de nombreuses années du fait de leur abondance, de leur caractère renouvelable, de leur non-toxicité, et de leur biodégradabilité (Chouana, 2017) et ils peuvent être exploités pour des applications médicales précises ; prévention de la thrombose par traitement à l'héparine, traitement local de l'arthrose par injection d'acide hyaluronique ou hyaluronane (Sinquin et Collic-jouault, 2014).

Ces macromolécules biologiques importantes constituent de bonnes sources des fibres alimentaires et prébiotiques avec des activités immuno-modulatrices, antioxydantes et antitumorales ainsi que autres avantages pour la santé (Nie et al., 2018). Les activités biologiques d'un polysaccharide dépendent de sa structure moléculaire, y compris l'unité de sucre, la liaison glycosidique de la chaîne principale, le degré de polymérisation de la branche et la configuration de la chaîne (Li et al., 2018).

L'objectif de notre travail est d'étudier l'effet inhibiteur des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des polysaccharides issus des bulbes d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae) vis-à-vis l'activation de la voie alterne de système du complément en utilisant la technique hémolytique d'AP100.

Ce manuscrit est structuré en trois parties. La première partie est une étude bibliographique, comporte une description détaillée de système du complément et un aperçu général sur la famille de Liliaceae, la plante étudiée *Urginea noctiflora*, ainsi que les polysaccharides et leurs activités immuno-modulatrice. La deuxième partie est l'étude expérimentale où nous avons réalisé l'investigation de l'effet des oligosaccharides sur l'activation du complément via la technique hémolytique fonctionnelle de la voie alterne (AP100) à fin de déterminer le taux d'inhibition de la voie alterne du complément des oligosaccharides étudiée. Le dernier chapitre présente les principaux résultats obtenus, avec leur discussion. Enfin, une conclusion générale suivie des perspectives achèvent ce travail.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.- Système du complément

I.1.- Généralités

Le complément est constitué d'un ensemble de protéines plasmatiques et membranaires présent à l'état inactif chez les sujets sains. Il constitue l'un des principaux mécanismes de destruction des substances étrangères de l'organisme. Bien que le complément soit un mécanisme de défense non spécifique il complète le système de défense adaptative c'est-à-dire il accroît leur efficacité (Dragon-Durey et Fremeaux-Bacchi, 2006). Ce système de plus de 30 protéines plasmatiques et membranaires d'origine hépatique à l'exception du C1q et des facteurs D et P (Gasque et al., 1996; Walport, 2001) est impliqué dans l'immunité innée intervenant dans la réponse inflammatoire, la destruction des agents infectieux, dans l'élimination des complexes immuns et le contrôle de la réponse immune spécifique (Dragon-Durey, 2006), Son activation s'effectue par des réactions de protéolyse en cascade (Weill et Batteux, 2003), les trois voies d'activation sont la voie classique (activé par la réaction antigène-anticorps), la voie alterne (activité par divers composés provenant en particulier de microorganismes comme les bactéries) et la voie des lectine (Walport, 2001; Weill et Batteux, 2003).

I.2.- Fonctionnement

I.2.1.- Voie classique

La voie classique est composée de molécules désignées par la lettre " C " suivie d'un nombre. Ces nombres ne respectent pas forcément l'ordre de la cascade d'activation puisqu'ils ont été attribués dans l'ordre de leur découverte (Jeandel, 2019). La voie classique est activée suite à la reconnaissance d'un complexe antigène-anticorps (Markiewski et Lambris, 2007), l'activation est initiée par la fixation du composant C1q, le C1q fixé sur les domaines CH2 du fragment Fc des IgG1, IgG2, et IgG3 et sur le domaine CH4 des IgM, Cette fixation libère le complexe C1 (C1q associé à 2 sérine estérases C1r et C1s) de son interaction physiologique avec la protéine régulatrice, le C1-Inhibiteur et entraîne l'auto-activation de C1r, qui clive et active ainsi C1s (Dragon-Durey, 2006), Après activation du C1, les composants C4 et C2 sont à leur tour activés et vont assembler sur la surface cible un complexe enzymatique, appelé C3 convertase classique "C4b2a" (Ripoche et al., 1989), la C3-convertase qui est liée à la surface du pathogène va cliver une grande quantité de C3 afin de produire C3b et C3a. Le C3b va opsoniser le pathogène tandis que C3a va initier une réponse locale pro-inflammatoire (Jeandel, 2019), Ce clivage de C3 conduit également à la formation d'une «C5-convertase» C4b2a3b (Volanakis et Arlaud, 1998), Ce complexe coupe la protéine C5 et initie les étapes ultimes de l'activation du complément par formation du Complexe d'Attaque Membranaire (Garlatti, 2008).

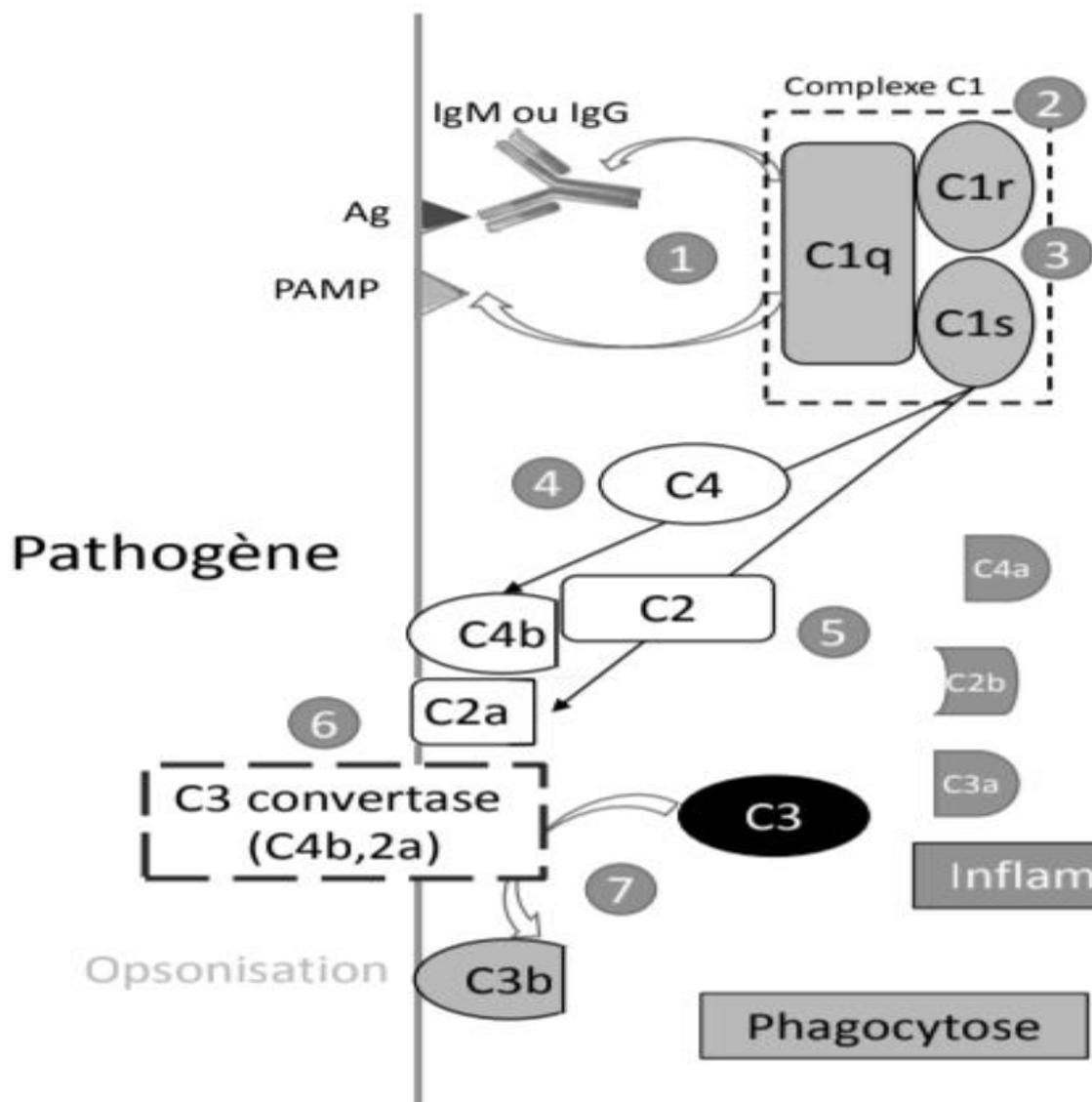


Figure 1 : Activation de la voie classique (Jeandel, 2019).

I.2.2.- Voie alterne

La voie alterne est déclenchée par les interactions directes des protéines du complément activées avec la surface cible (bactérie, virus, parasite, cellule tumorale...), ce qui en fait une composante de l'immunité innée (Markiewski et Lambris, 2007). L'activation de la voie alterne du complément est un mécanisme capable d'auto-amplification important pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en l'absence d'anticorps spécifiques, la voie alterne amplifie également l'activation du complément initiée par les deux autres voies, classique et lectines (Dragon-Durey, 2006). La voie alterne du complément n'est pas initiée par une liaison spécifique-protéine mais est activée en permanence par l'hydrolyse spontanée du C3, formant du C3(H₂O), processus appelé le «tick-over» (Pangburn et al., 1981). Ce processus provoquant ainsi un changement conformationnel de cette dernière. Ce changement

de conformation permet la fixation du facteur B qui est ensuite clivé par le facteur D en B et Bb. Ce dernier fragment se fixe à C3(H₂O) pour former le complexe C3(H₂O)Bb (Forneris et al., 2010). Ce complexe est une C3 convertase soluble formée en très faible quantité (Spitzer et al., 2007), ce premier C3 convertase permet le clivage des autres molécules C3 à C3a et C3b. C3a agit comme anaphylatoxins (Nordahl et al., 2004), et C3b s'attache de façon covalente à la membrane de pathogènes ou de cellules de l'hôte via son groupe thioester (Spitzer et al., 2007), le facteur B, fixé au C3b, pourra ensuite être clivé par le facteur D pour former la C3 convertase alterne (C3bBb) (Benmansour, 2021), Il peut également former un complexe C3b2Bb appelé « C5 convertase » (Garlatti, 2008).

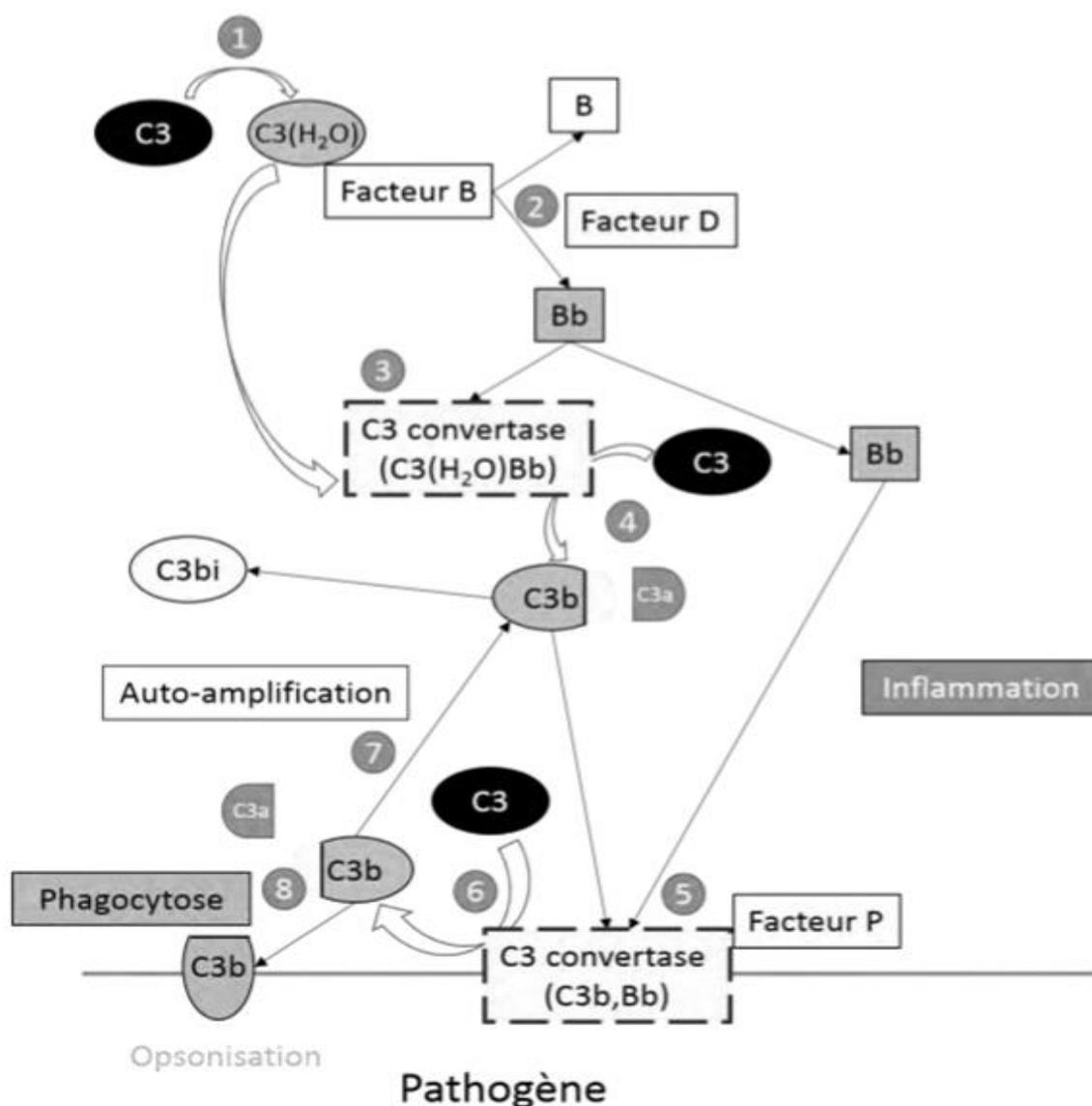


Figure 2 : Activation de la voie alterne du complément (Jeandel, 2019).

I.2.3.- Voie de lectine

La voie lectine ne requière pas la présence d'un anticorps et relève de l'immunité innée, elle s'apparente grandement à la voie classique (Martel, 2004). La voie des lectines est initiée à la suite de la reconnaissance de résidus glycaniques par le complexe constitué de l'association de lectines, comme la MBL ou les ficolines, avec des sérine estérases, les MASP (Dobó et al., 2016), la protéine MBL qui se fixe sur les hydrates de carbone des micro-organismes (Dragon-Durey, 2006), cette protéine est proche de C1q et circule en faible concentration dans le sang mais sa production par le foie peut être augmentée lors de la phase aigüe de l'inflammation, les ficolines qui sont associées aux MASP et circulent jusqu'à reconnaissance des groupes N-acetyl-glucosamine à la surface de bactéries (Jeandel, 2019) les MASP, 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, 2006). La C3-convertase liée à la surface du pathogène va cliver une grande quantité de C3 afin de produire C3b et C3a. C3b va opsoniser le pathogène tandis que C3a, C4a et C2b vont participer à l'inflammation (Dragon-Durey, 2006).

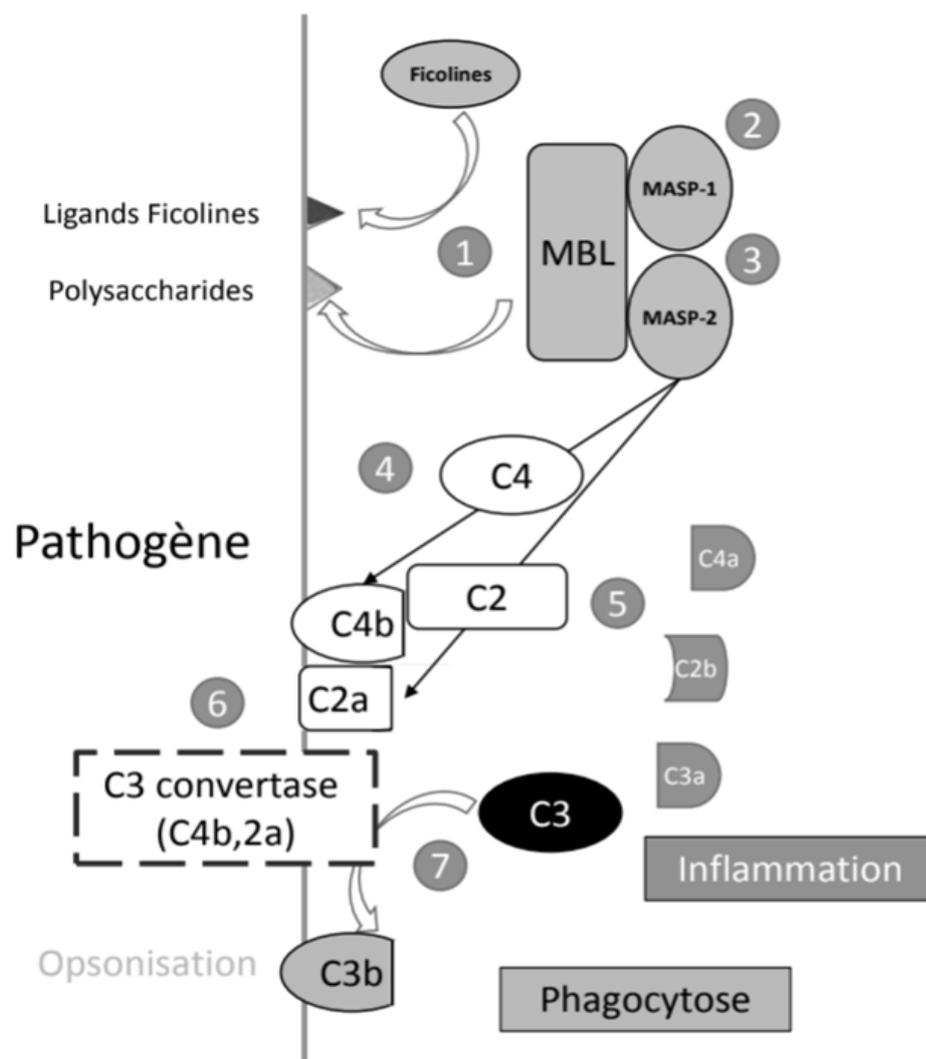


Figure 3 : Activation de la voie associée aux lectines du complément (Jeandel, 2019).

I.2.4.- Voie finale

Les trois voies d'activation, la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines , aboutissent à la formation de complexes enzymatiques macromoléculaires (C3 convertases), capables de cliver le composant C3 en C3a et C3b (Dragon-Durey, 2006), la fixation des molécules de C3b supplémentaires aux C3 convertase classique ou alternes leur confère une activité C5 convertase (Lutz et al., 2006), le C5 convertase qui clive la protéine C5 en deux fragments, le C5a et le C5b, Ces deux convertases (C3 et C5 convertases) sont des composants essentiels pour la lutte contre les pathogènes. Le C3b permet en effet l'opsonisation du cible, il est à l'origine d'une réponse inflammatoire induite par les anaphylatoxines C3a et C5a (Morgan et al., 2016). Tandis que le C5b peut s'associer aux protéines de la voie finale commune présentes dans le plasma ; les composants C6, C7. Ce complexe fixera le C8 qui commencera un ancrage dans la membrane plasmique (Morgan et al., 2016). Le complexe C5b8 s'associe alors à 6 à 12 molécules de C9 qui en se polymérisant vont créer un véritable pore transmembranaire. Ainsi le complexe d'attaque membranaire (appelé mC5b9) permet une lyse osmotique de la cible (microorganisme, cellule transformée) (Donnette-Le Quintrec, 2013). Ce dernier va permettre aussi la sortie de solutés et d'ions présents dans le cytoplasme ainsi que l'entrée d'enzymes comme des lysozymes dans la cellule. L'ensemble de ces perturbations va provoquer la destruction complète du pathogène par lyse cellulaire. La molécule C5a relarguée au cours de la voie finale commune participera quant à elle à l'inflammation (Jeandel, 2019).

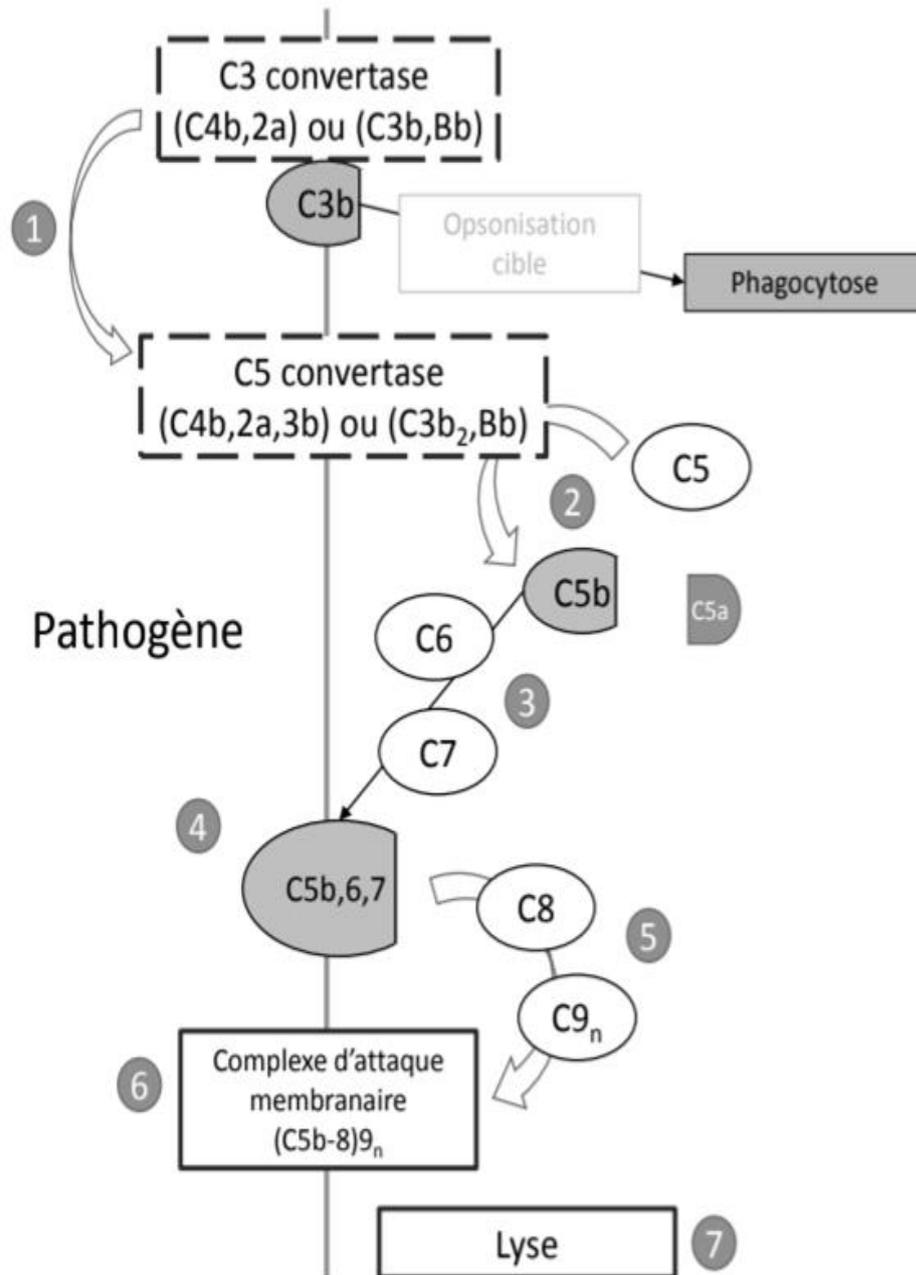


Figure 4 : Voie finale commune (Jeandel, 2019).

I.3.- Rôles

I.3.1.- Opsonisation

Les deux fragments les plus volumineux provenant du clivage du C3 et du C4 sont des opsonines et leurs produits de dégradation, le iC3b, C3dg et C3d. Les MBL, Ficolines et C1q sont capables de jouer ce rôle, opsonines c'est-à-dire qu'elles favorisent la phagocytose des antigènes en se liant à ces derniers, ces opsonines liées à la substance à éliminer sont reconnues par des récepteurs spécifiques (CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) et le CR4

(CD11C/CD18) et (CRIg) portés par les cellules phagocytaires (Donnette-Le Quintre, 2013; Walport et al., 2001).

I.3.2.- Rôle pro-inflammatoire

Les anaphylatoxines C3a, C4a et C5a, peptides libérés lors de l'activation du complément, sont des médiateurs prépondérants de l'inflammation, Les anaphylatoxines C3a et C5a sont les deux plus importantes compte tenu de leurs activités biologiques. Outre leur capacité d'induire un choc anaphylactique, ces peptides interviennent dans la réponse inflammatoire en provoquant la contraction des muscles lisses, la vasodilatation et l'augmentation de perméabilité vasculaire (Sayah et al., 1998).

I.3.3.- Lyse des pathogènes

Le complexe d'attaque membranaire forme des pores transmembranaires à la surface des cellules cibles. Ces pores, en laissant passer des molécules d'eau et des petits ions à travers la membrane plasmique, sont responsables de la lyse cellulaire. L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire induite par les CAM peut également à des concentrations lytiques induire une dysfonction des mitochondries et est susceptible d'induire la mort cellulaire (Fishelson, 1991).

I.4.- Régulation et activation inappropriée

I.4.1.- Régulation du complément

Le complément est un composant important du système immunitaire qui intervient dans la réponse inflammatoire, la destruction des agents infectieux, dans l'élimination des complexes immuns et le contrôle de la réponse immune spécifique (Rosain, 2014). Dans les conditions normales, le complément est étroitement contrôlé par un certain nombre de protéines solubles et membranaires pour éviter de blesser les tissus autologues et intervient pour inhiber l'activation et réduire la demi-vie des composants actifs (C4b, C3b, C5b, C3 et C5 convertases). Lorsque le complément est hyperactivé, comme cela se produit dans les maladies auto-immunes ou chez les sujets présentant des protéines régulatrices dysfonctionnelles, il entraîne une réponse inflammatoire sévère dans de nombreux organes (Donnette-Le Quintrec, 2013 ; Noris e & Remuzzi, 2013).

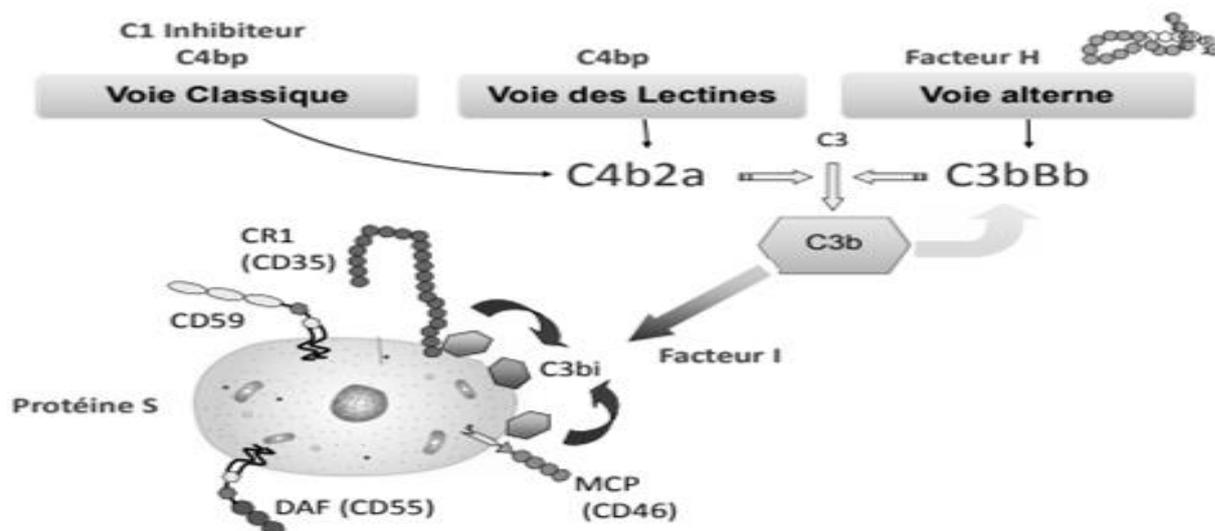


Figure 5 : Régulation d’activation de système du complément (Kulkarni et Afshar-Kharghan, 2008, Noris e &Remuzzi, 2013).

Tableau 1: Protéines régulatrices du complément (Ripoche et al., 1989 ; Noris e &Remuzzi, 2013).

Protéine régulatrice	Membranaire ou plasmatique	Fonction
C1 INH	Sérique	Dissocie complexe C1 activé
C4BP (Binding Protein)	Sérique	Dissocie la C3 convertase de la voie classique Co-facteur du facteur I
Properdine (facteur P)	Sérique	Stabilisé les convertase de la voie alterne
Facteur H	Sérique	Dissocie la C3 convertase de la voie alterne Co-facteur du facteur I
Facteur I	Sérique	Dégrade les opsonines C4b et C3b
Protéases sériques	Sérique	Inactivent les anaphylatoxines

Vitronectine (protéine S)	Sérique	Empêche le complexe terminal de se lier aux membranes
CR1	Membranaire	Dissocie la C3 convertase Co-facteur du facteur I
DAF(Decay Accelerating Factor, CD55)	Membranaire	Dissocie la C3 convertase Co-facteur du facteur I
HRF (homologous Restrictions Factor, C8BP)	Membranaire	Inhibe la formation du complexe terminal
CD59 (protectine)	Membranaire	Inhibe la formation du complexe terminal

I.4.2.- Activation inappropriée du complément

L'activation incontrôlée du complément est désastreuse pour l'organisme, entraînant des dommages tissulaires importants et des réactions anaphylactiques. Un système relativement complexe contrôle donc en permanence l'activation de ce système, lui permettant notamment, avant la phase immune et en collaboration avec elle, de distinguer le soi du non-soi (Ripoche *et al.*, 1989). Ce système doit être régulé efficacement car il est très performant et donc potentiellement dangereux. Un dysfonctionnement de la régulation du complément entraîne des situations pathologiques (lupus, glomérulonéphrite..) (Régis *et al.*, 2006).

Tableau 2 : Pathologies associées de déficiences en protéines du complément (Martel, 2004).

Composant déficient	Manifestation clinique
Clq, s	LES, infections bactériennes
C2	Les infections respiratoires, Infections récurrentes (Neisseria)
C3	Infections bactériennes, glomérulonéphrites
C4 , C4a, C4b	Maladies auto-immunes
C5	Infections récurrentes (Neisseria)
C6	Infections récurrentes (Neisseria)
C7	Infections récurrentes (Neisseria)

C8	Infections récurrentes (Neisseria)
C9	Infections sévères et fulminantes (Neisseria), Septicémie.
Properdine	Infections (Neisseria), glomérulonéphrites, syndrome hémolytique et urémique (H US).
Facteur H	Méningite, infections pyogéniques.
Facteur I	OEdème angioneurotique héréditaire (HANE)
C1-INH	Hémoglobinurie paroxystique nocturne (PNH).
C8BP	PNH
DAF	PNH
CD59	Infections bactériennes récurrentes de la peau
CR3	

I.5.- Traitements anti-complément

I.5.1.- Eculizumab

L'éculizumab est un bloqueur du composant 5 du complément, qui bloque le clivage du C5, a permis d'améliorer le pronostic rénal des patients traités. Il a prouvé son efficacité avec 85 % de réponse, que les patients soient plasmarésistants ou plasmadépendants. Il permet un meilleur contrôle de la maladie rénale que la plasmathérapie (Servais *et al.*, 2014 ; Bauvois *et al.*, 2019). L'éculizumab est un anticorps thérapeutique qui neutralise le composant C5 du complément et ainsi inhibe la voie finale commune du complément (Passotet *al.*, 2017).

I.5.2.- Ravulizumab

C'est un médicament utilisé pour traiter certains troubles qui affectent les globules rouges (Ranodeu, 2020) il est un inhibiteur de C5 à longue durée d'action, obtenue par modifications sélectives de l'eculizumab, a une demi-vie est plus longue que celle de l'éculizumab (Gäckler *et al.*, 2020; Kulasekararaj *et al.*, 2020 ; Rondeau *et al.*, 2021), Il est classé comme un anticorps monoclonal , qui se lie à la protéine du complément C5 avec une sélectivité élevée et inhibe son clivage en (C5a et C5b), empêchant ainsi la formation de ce que l'on appelle le complexe final C5b-9 (Tanaka *et al.*, 2021).

II.- *Urginea noctiflora*

II.1.-Présentation, classification taxonomique et utilisation

Appartient à la famille des Liliaceae qui comprend environ 280 genres et plus de 4000 espèces qui poussent dans le monde entier. Elle constitue l'une des grandes familles de plantes à fleurs médicinales. Elles constituent le taxon principal des monocotylédones. Chez les Liliacées, les feuilles sont parallélinerves, certaines sont ligneuses comme le yucca du Mexique et d'autres sont des herbacées (Goetz et Ghédira, 2012). Cette famille tient une place importante dans la flore méditerranéenne et dans celle des régions steppiques des divers continents (Ozenda, 1977). La famille des Liliaceae est représentée au Sahara par plusieurs genres dont le genre *Urginea* (Ozenda, 1977; Quézel et Santa, 1963).

Ce genre est répandu dans toute la région méditerranéenne, il comprend environ 40 espèces actuellement identifiées. Les études éthno-pharmacologiques ont indiqué qu'indépendamment de la zone de croissance, les espèces d'*Urginea* sont utilisées pour traiter les troubles cardiovasculaires, respiratoires, articulaires et les problèmes cutanés. Ces espèces contiennent des composés glycosylés qualifiés de glycosides cardiaques comme principes actifs majeurs. En outre, des composés phénoliques, des phytostérols, des protéines et de l'acide oxalique ont également été isolés de ces espèces (Bozorgi et al. 2017 ; Pretorius et al. 2005). *Urginea noctiflora* Batt & Trab est une plante bulbeuse à bulbe volumineux profondément enfoncé dans le sol (Ozenda, 1991 ; Quézel-santa, 1962). Commun au Sahara septentrional. Elle est utilisée, sous forme de poudre et de compresses, pour traiter des plaies et des maux d'oreille.





Figure 6: *Urginea noctiflora* (Benaoun, 2017).



II.2.- Polysaccharides du genre *Urginea*

Tableau 3 : Effets pharmacologiques et composition de plusieurs extraits issus de quelques espèces du genre *Urginea* (Benaoun, 2017).

Espèces	Activités biologiques	Parties utilisées	Composition des extraits	Références
<i>U. maritima</i> (L.)	Anti-bactérienne Expectorante Anti-cancéreuse Diurétique	Bulbes	Sinitrines Fructo-oligosaccharides Glycosides cardiaques	Praznik et Spies, 1993 Spies et al., 1992 El-Seedi et al., 2013
<i>U. undulata</i> (Desf.)	Anti-oxydante Anti-bactérienne Anti-inflammatoire	Bulbes	Polyphénols Flavonoïdes Glycosides cardiaques	Sharaf et al., 2017
<i>U. fugax</i> (Moris)	Cardiotonique	Bulbes	Glycosides cardiaques Cardénolides	Krenn et al., 2004
<i>U. pancratiion</i> (Steinh.)	Cardiotonique	Bulbes Feuilles	Glycosides cardiaques Polysaccharides Bufadiénolides	Krenn et Kopp, 1998 Bouzidi et al., 2010

III.- Effets immunomodultrices des polysaccharides

L'immunomodulation est un processus de modification de la réponse immunitaire, d'une manière positive ou négative, par l'administration d'un médicament ou d'une substance active (Ganju *et al.*, 2003). Les polysaccharides sont capables de stimuler simultanément les différentes composantes du système immunitaire, ce qui leur confère différentes propriétés thérapeutiques, notamment des propriétés antitumorales et anti-inflammatoires. Pour cette raison, ils sont appelés immunomodulateurs, immunostimulateurs ou modificateurs de la réponse immunitaire (Sanchez, 2006).

III.1.- Effet anti-inflammatoire

L'inflammation est l'ensemble des réactions déclenchées dans un organisme, par une agression qui peut être d'origine immunitaire ou non (traumatique, infectieuse, chimique..), Cet ensemble de phénomènes réactionnels siégeant dans les tissus vascularisés a pour finalité de limiter et de réparer les effets de l'agression (Zhou et Jian, 2006), Les médicaments utilisés pour la gestion des affections inflammatoires, C'est le cas de l'utilisation des substances anti inflammatoires. Ces dernières agissent de façon symptomatique sur l'agent agresseur, elles sont divisées en trois grandes classes : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les anti-inflammatoires stéroïdiens(AIS) et les anti-inflammatoires d'origine végétale (Chebira et Boudjaadar, 2014). La réaction inflammatoire est une réponse de l'organisme à une agression, Cette dernière est souvent bénéfique mais il arrive parfois qu'elle endommage les cellules et les tissus (Rioux, 2010). Les fucanes sont des polysaccharides sulfatés présents dans la matrice intercellulaire. In vitro, ces polysaccharides des algues brunes Phaeophyceae induisent l'agrégation plaquettaire. Certains fucanes sont anti-inflammatoire et plusieurs fucanes présentent aussi des potentialités anti-tumorales(Bruneton, 2009).

III.2.- Effet anti-tumorale

Des études ont suggéré que les polysaccharides peuvent inhiber la croissance tumorale par des mécanismes communs tels que la prévention de l'oncogenèse par la consommation orale de préparations actives, une activité anticancéreuse directe (comme l'induction de l'apoptose des cellules tumorales) (Zong *et al.*, 2012). Les effets anti-tumorales des polysaccharides ont été évalués sur le carcinome hépatocellulaire. Les polysaccharides de la ont montré un effet inhibiteur significatif sur les cellules H22 les lignées cellulaires hépatique et ont inhibé significativement la croissance des tumeurs H22 transplantées chez la souris. Le traitement avec les polysaccharides a régulé de manière significative les expressions de Bax, caspase 3 et caspase 9 dans les cellules H22, alors que l'apoptose était significativement régulée (Dou *et al.*, 2016).

III.3.- Effet anti-complément

Dans le sang, le système du complément est responsable de la lyse des globules rouges, Le terme activité anti-complément se rapporte à l'inhibition observée de l'hémolyse due à l'interaction entre les protéines du complément et un principe actif (Morgan et Harris, 2003). L'héparine c'est un polysaccharide sulfaté connue pour ses propriétés inhibitrices du complément, L'héparine agit comme inhibiteur de l'activation du complément par son interaction avec les C3 convertase (Colliec et al., 1990).

Tableau 4 : Activité anti-complément des polysaccharides.

Espèces	Polysaccharides	Compositions	Propriété	Référence
<i>Hedyotis diffusa</i>	HD-PS-1	Possèdent une chaîne principale de $\rightarrow[4]-\beta\text{-GlcP}-3\text{-OAc}-(1)6\rightarrow[6]-\beta\text{-Manp}-(1)2\rightarrow6)-\alpha\text{-Galp}-(1\rightarrow[4]-\alpha\text{-Galp}-(1)2\rightarrow$, avec trois branches de $\beta\text{-Manp}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-GlcP}$, $\alpha\text{-Rhap}-(1\rightarrow3)-\alpha\text{-Rhap}$ et $\alpha\text{-Galp}$ attaché à la chaîne du squelette en position O-4 du $\beta\text{-Manp}$ lié en 1,4,6, en position O-3 du $\alpha\text{-Gal}$ lié en 1,3,6 et en position O-3 du lié en 1,3,4 $\alpha\text{-Galp}$.	*Homopolysaccharides acide *Présence d'acides uroniques est importante pour l'activité anti-complément de HD-PS-1	(Huo et al., 2020)
<i>Thymus vulgaris L.</i>	3TV-3-IIIa-IIa	Galacturonique (44,8 mol%), d'acide glucuronique (16,7 mol%), d'arabinose (11,1 mol%), de rhamnose (9,2 mol%), de galactose (8,9 mol%) et de petites quantités de glucose, xylose, mannose et fucose.	*Poids moléculaire : 180 kDa.	(Chun et al., 2001)
<i>Bupleurum chinense</i>	BC-PS2	Gal, GalA, Glc, Ara et Man dans le rapport de 1,6:1,1:1,8:1,7 : 1.0, ainsi que des traces de Rha, Fuc et Xyl. Les	*Homopolysaccharides *Poids moléculaire 2000	(Di et al., 2013)



		principales liaisons des résidus de BC-PS1 comprennent Galp (GalA) terminal, lié en 1,4 et lié en 1,3, Glcp terminal et lié en 1,4, Araf terminal et lié en 1,5, 1,4,6-linked Manp.	KDa	
<i>Juniperustibetica Kom.</i>	YB-PS	Composé d'Ara, Gal et Glc avec un rapport molaire de 5,8:3,0:1,2. Son squelette était composé d' α -Araf lié en 1,3, d' α -Araf lié en 1,3,5, d' α -Galp lié en 1,2,4 et d' α -Glc lié en 1,3 avec l' α -Ar.	*Homopolysccharide	(Li et al., 2019).
			*YB-PS est un inhibiteur potentiel du complément pour traiter les maladies liées à une activation excessive du système du complément.	
<i>Bupleurumsmithii</i>	D3-S1	Ara, Gal et GalA,Rha, Glc, Xyl et Man	*Poids moléculaire 2000 KDa	(Xu et al., 2007).
<i>Rehmanniaglutinosa</i>	Rehmannane SA	Rehmannan SA est principalement constitué d'unités structurales de type arabino-3,6-galactane.	*Polysccharides Acides	(Tomoda et al., 1994)

Chapitre II
Matériel et méthodes

II.1.- Matériel d'étude

II.1.1.- Produits chimiques

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° 6. Aussi l'origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation sont indiquées dans le tableau N° 5.

II.1.1.1.- Tampons

Les solutions utilisées dans ce test, (ACP); tampon de la voie alterne qui contient le PBS/EGTA/Mg⁺⁺ dont les portions (10/1/1 V/V) d'un pH neutre, (PBS) ; solution saline tamponnée au phosphate. La nature, la concentration, le rôle, la composition et la méthode de préparation des solutions, de MgCl₂, d'HCl, NaOH et EGTA utilisées dans la préparation des solutions tampons aussi le gel d'agarose sont indiquées dans le tableau N° 7.

II.1.1.1.1.- Tampon ACP (pH : 7,4)

Est du PBS contenant 100mM d'acide éthylène glycol-bis (β-aminoéthyl éther)N,N',N'-tétraacétique (EGTA) et 7 mM MgCl₂ ; La voie alterne ne nécessite pas des ions Ca²⁺ pour l'activation, mais elle nécessite des ions Mg²⁺ (Frimat, 2013). Ainsi, l'activation de la voie alternative se fait en présence de Mg⁺⁺/ EGTA, qui chélate les ions de Ca²⁺, donc la voie classique est bloquée par ce réactif (Jeong *et al.*, 2004). Dans un bécher contenant 100ml du PBS ajouter 5ml d'EGTA à concentration 100 mM et 5ml de MgCl₂ à concentration 7mM pour obtenir l'ACP : PBS/EGTA/ MgCl₂ dont les portions 10/1/1 V/V ;

II.1.1.1.2.- Tampon PBS (pH :7,4)

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 Di-hydrogène phosphate de potassium anhydre KH₂PO₄ (1,5mM), et 0,92g d'Hydrogène phosphate disodique anhydre Na₂HPO₄ (8,1mM) (YOUNG *et al.*, 2012).



Tableau 5 : 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.
Centrifugeuse	SIGMA	SIGMA. 15PK, 14000 RPM	GERMANY
Becbunsen	BOCHEM	BOCHEM. T :1300°C	GERMANY
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 6 : 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 ³	Pureté %
Chlorure de magnésiumhydraté	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	MgCl ₂ 6H ₂ 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	Liquide	CH ₃ OH	32.04	0.79	99.9
Acide tri-fluoro-acétique(TFA)	SIGMA ALDRICH	Liquide	CF ₃ COOH	114,02	1,49	99.8
Phosphate de potassium dibasique	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	KH ₂ Po4	136.09	2.338	99
Hydrogénophosphatedisodiqueanhydre	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Poudre	Na ₂ HPO ₄	141,96	1.63	99.5
Chlorured'hydrogène	SIGMA-ALDRICH	Liquide	HCl	36,458	1.19	37
Ethylène Glycol Bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-	SIGMA-ALDRICH	Poudre	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	380,35	1.4	97
Gel d'agarose		Poudre				



Tableau 7 : 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 (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraaceticacid) 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 7,4. 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.
Gel d'agarose					Chauffer le stock d'agarose à 2% et, à l'aide d'une pipette stérile prélever un volume de 15ml dans des flacons et conserver à 56°C. 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.

II.1.2.- Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est constitué des bulbes d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae), les érythrocytes et le sérum humain normal.

II.1.2.1.- Extraction des polysaccharides hydrosolubles

15 grammes des bulbes d'*Urginea noctiflora* sont mises en suspension dans 200ml d'eau ultra pure. Le mélange est homogénéisé sous agitation à 160rpm pendant 2h à 60°C à l'aide d'un agitateur à pales puis filtré à travers un tissu à mailles fines pour retirer les graines (Culot). La macération est répétée 3 fois sous ce contexte. Les polysaccharides présents dans le filtrat sont précipités par 3 volumes d'éthanol 1200ml pour toute une nuit à 4°C et récupérés le lendemain après 15min de centrifugation où ils ont été lavés à trois reprises avec 100 ml de l'acétone. Les polysaccharides obtenus sont ensuite séchés à l'étuve à 40°C et broyés à main en poudre fine. Les polysaccharides issus de cette opération sont préservés dans un Eppendorf (Benaoun et al, 2017).

II.1.2.2.- Hydrolyse des liaisons Osidiques

Les fractions des oligosaccharides sont obtenues à partir des polysaccharides hydrosolubles isolés des bulbes d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab. La dépolymérisation des polysaccharides est réalisée par une hydrolyse acide partielle des liaisons glycosidiques. Une quantité de 10mg de polysaccharide de d'*Urginea noctiflora*, est hydrolysée dans un tube en verre à bouchon vissant à l'aide de 1ml de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0.05M pendant 30minutes à 80°C (Genestie, 2006; Boual et al., 2011). 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 (Xia et al, 2020).

II.1.2.3.- Le sang

Le sang (2 ml) est prélevé à partir de volontaire sain, de sexe masculin, âgé de 20 à 50ans (Du et al., 2016) le jour même de son utilisation au niveau de laboratoire IBN ROCHD Ghardaïa. L'absence d'antigène HBs, d'anticorps anti-VIH et d'anticorps anti-VHC est vérifiée. Ainsi, le groupage des patients est confirmé (Koko et al, 2008).

II.2.- Méthodologie d'étude du test AP100

La technique AP100 est une technique hémolytique sur gel permet d'explorer la voie alterne du complément utilisant des globules rouges pour tester la mesure de la lyse des érythrocytes en présence de sérum humain normal (SHN) (Xia et al., 2020). Les analyses

fonctionnelles sont basées sur la capacité du complément à induire la lyse des érythrocytes, les dosages hémolytiques d'AP100 permettent aussi de mesurer l'activité fonctionnelle des protéines du complément (Frémeaux-Bacchi *et al.*, 2012).

II.2.1.- Hématies et sérum

Les hématies et le sérum sont obtenues selon la méthode décrite par (Samuelsen *et al.*, 1999 ; Thuong *et al.*, 2006). Tout d'abord, on prélève 2ml du sang des volontaires sains âgés de 20-50 ans et on verse le sang dans un tube à centrifugation contenant l'anticoagulant (héparine). Après séparation du sérum au culot cellulaire, ce dernier est est avec le tampon de la voie alterne (ACP) trois fois. Pour obtenir une suspension de globules rouges de 10% , on ajoute 5,4 ml d'ACP au 0,6 ml de globules rouges. Le sérum est préparé à partir du sang prélevé dans un tube sec et dilué aussi dans le tampon de la voie alterne (ACP) à une concentration de 1:6. Le sérum dilué va servir par la suite comme source du complément.

II.2.2.- 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'hydrolysate 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° 8.

II.2.3.- Boîtes d'AP100 (Gel d'agarose et érythrocytes)

Pour préparer les boîtes, mélanger le gel, avec 2ml de la suspension de globules rouge 10% préparée précédemment à 45°C ensuite verser le mélange dans les boîtes Pétri et éliminez les bulles. Laisser 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 7puitts 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 effectuées par trois étapes ;



Tableau 8 : Méthode de dilution des oligosaccharides d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae)

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 9 : Position systématique et usages thérapeutiques de la plante *Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae)

Famille	Nom scientifique	Nom Arabe	Vivace/ Éphémère	Répartition	Partie utilisée	Mode d'utilisation	Indications traditionnelles
Liliaceae	<i>Urginea noctiflora</i>	بصيص الفار	Éphémère	Commun au Sahara septentrional	Bulbes	Poudre	traitement des plaies et des maux d'oreille

II.2.4.- Test anti-complément AP100

II.2.4.1.- Pré-incubation

Après la dilution des oligosaccharides d'*Urginea noctiflora* 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 à 37° C pendant 10minutes (Hourcade, 2016 ; Wang *al.*, 2016 ; Weihua *et al.*, 2020).

II.2.4.2.- Incubation

L'incubation des mélanges réactionnels du test anti complément ; oligosaccharides, héparine et SHN est effectuée dans des boîtes du Pétri d'AP100 déjà préparées (Zhang *et Chen*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2015). Les boîtes 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 (Zhang *et Chen* 2008 ; Zhang *et al.*, 2015). Les puits dans chaque boîte d'AP100 ont été préparés, **(i)** : Echantillon: 25µl de chaque dilution de solution des oligosaccharides d'*Urginea noctiflora* ; 200µg/ml, 400µg/ml, 600µg/ml ,800µg/ml, 1000µg/ml . **(ii)** : Contrôle positif : 25µl de l'héparine ; 1000µg/ml. **(iii)** : Contrôle négatif : 25µl du SHN diluée à 1:6.

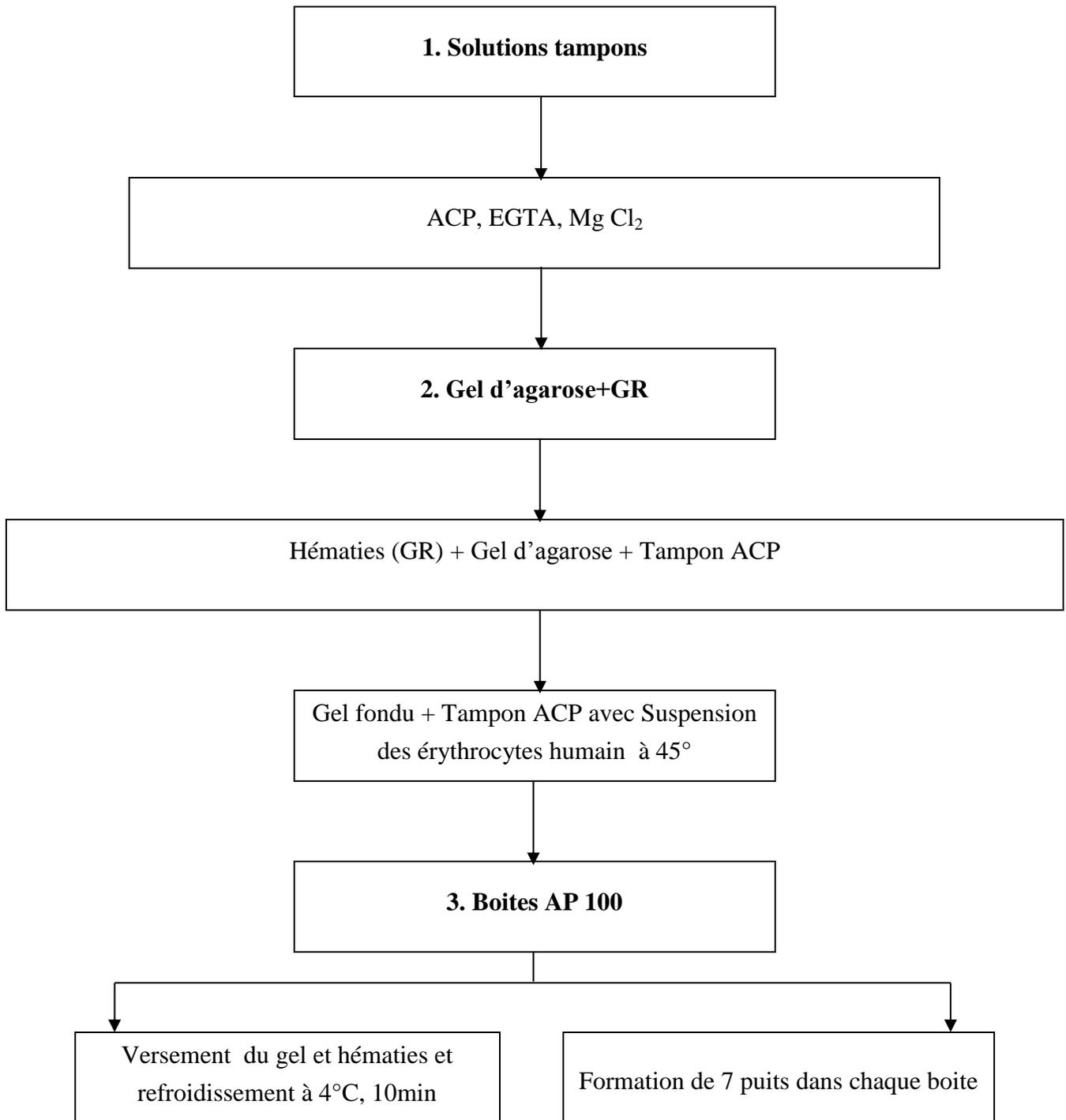


Figure 7 : Schéma de différentes étapes de préparation des boîte AP100

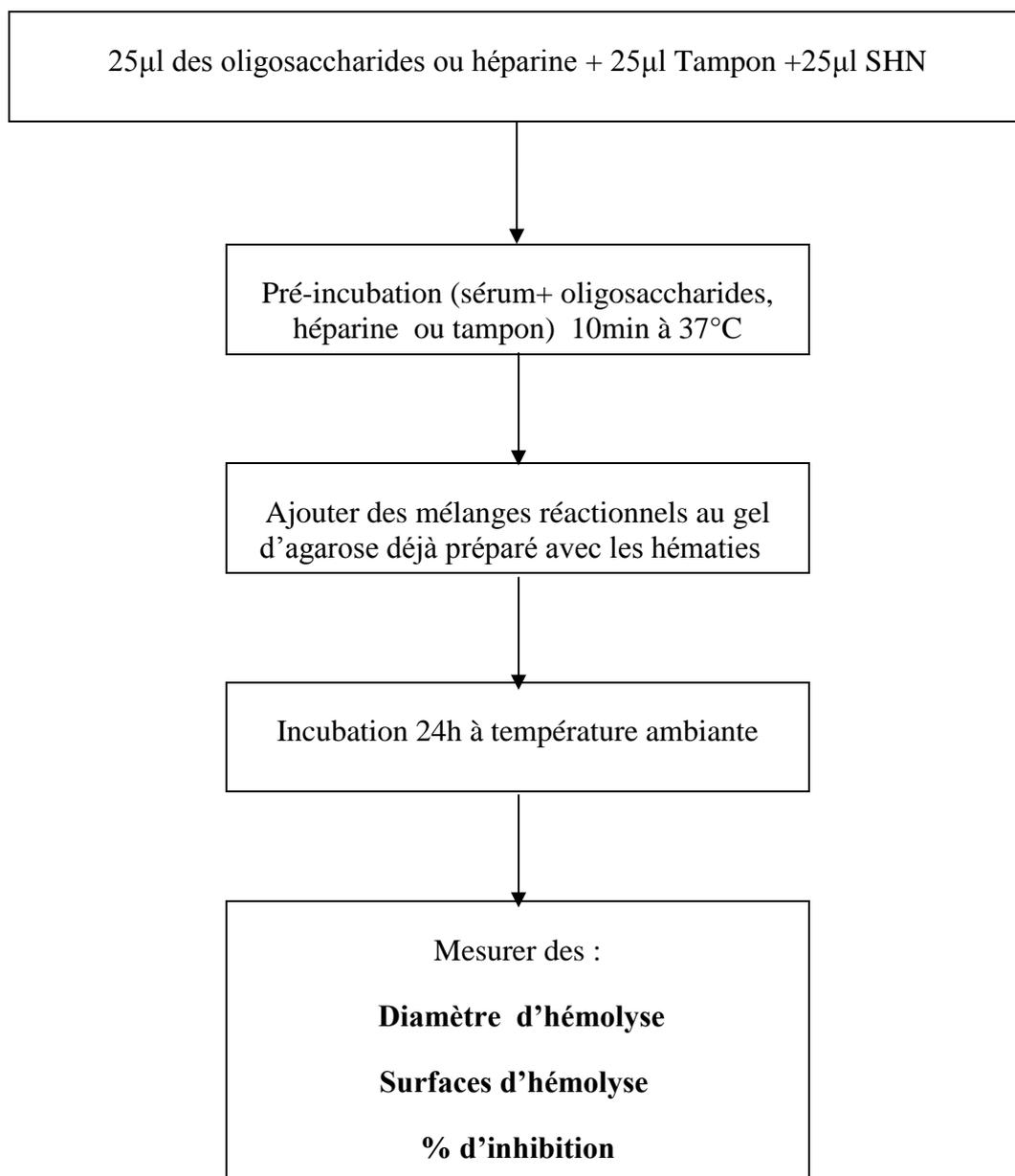


Figure 8 : Schéma de différentes étapes de test AP100 (Zhang *et al.*, 2015) modifié



Tableau 10 : Test anti-complément AP100 (7 puits pour chaque boîte Pétri)

Concentrations des oligosaccharides (µg/ml)		0	200	400	600	800	1000
Contrôle positif	Sérum ; 1:6 (µl)	/	/	/	/	/	25
	Héparine (µl)	/	/	/	/	/	25
<i>Urginea noctiflora</i>	Sérum ; 1:6 (µl)	25	25	25	25	25	25
	Oligosaccharides (µl)	25	25	25	25	25	25
Contrôle négatif	Sérum ; 1:6 (µl)	25	/	/	/	/	/
	Tampon (µl)	25	/	/	/	/	/

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

II.2.5.- Expression des résultats

Les zones de lyse obtenues après l'incubation sont mesurées pour calculer les surface d'hémolyse, les pourcentage de lyse et les taux d'inhibitions du complément.

II.2.5.1.- 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 ($r = D/2$), π : 3,14.

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

II.2.5.2.- 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

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

II.2.5.3.- 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.

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

Chapitre III
Résultats et discussion

III.- Inhibition de la voie alterne par les oligosaccharides (AP100)

Les pourcentages de l'inhibition de l'activation de la voie alterne du complément en présence des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partiel des polysaccharides extraits d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae) et l'héparine sont représentés dans **la figure 9** et **la figure 10**.

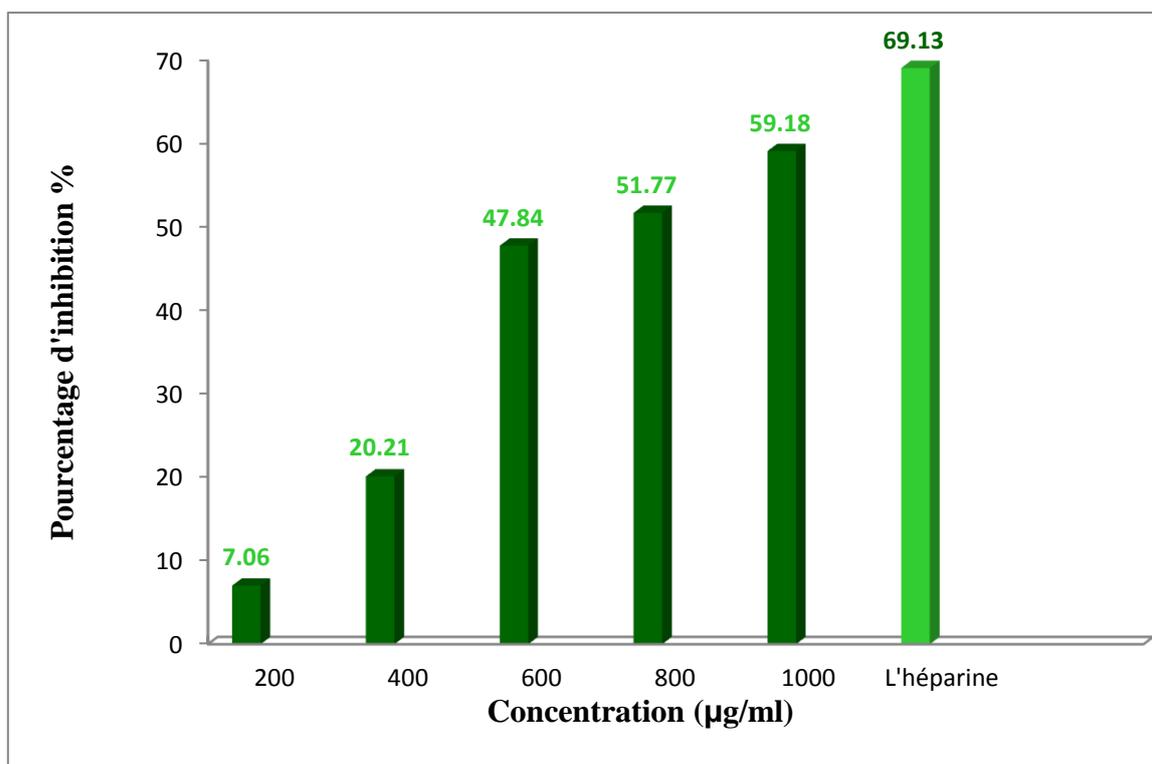


Figure 9 : Histogramme représente les pourcentages de l'inhibition de l'hémolyse en présence des oligosaccharides d'*Urginea noctiflora* et l'héparine.

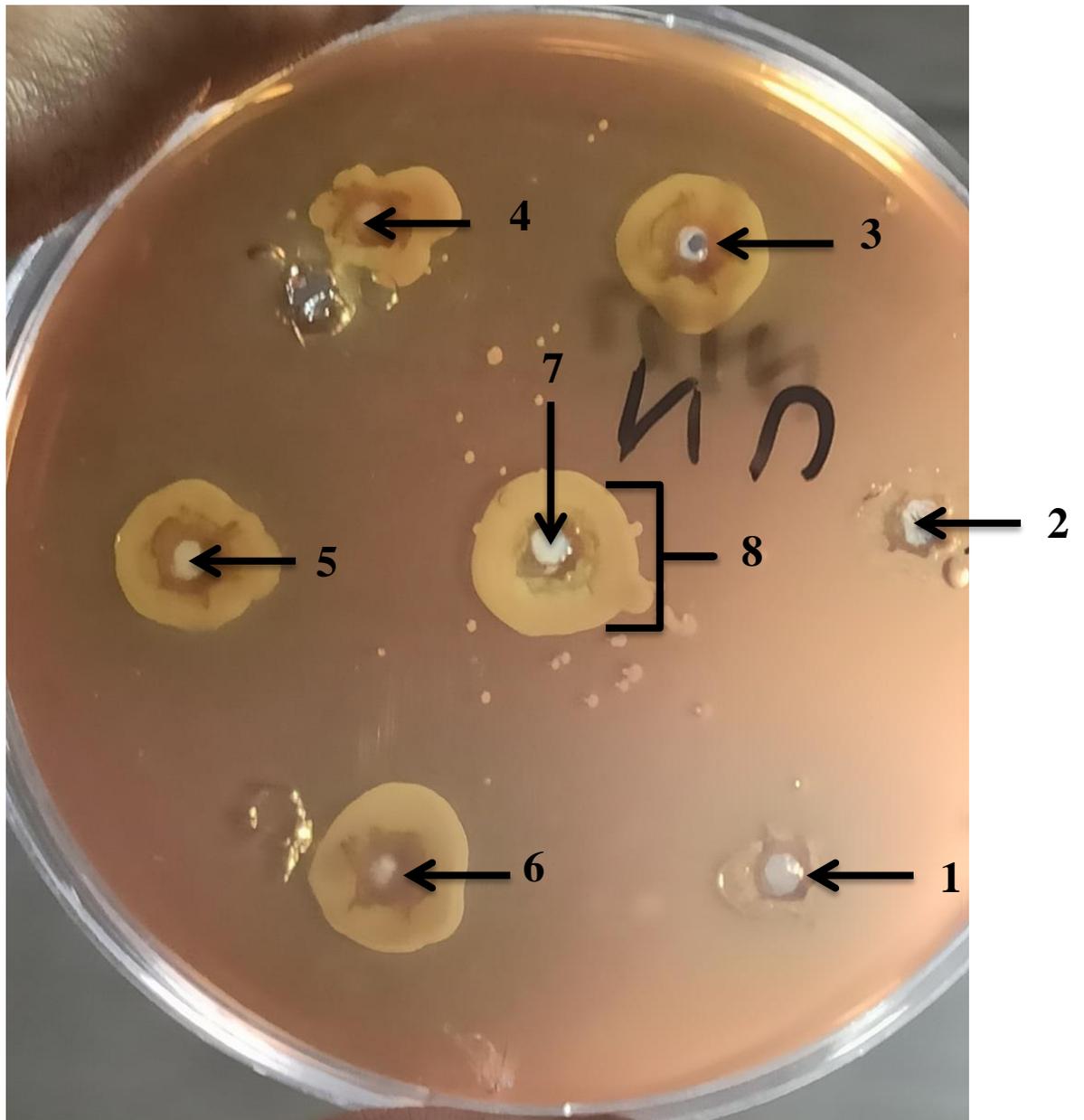


Figure 10 : Test AP100 ; Inhibition de la lyse des hématies par l'activation de la voie alterne du complément par les oligosaccharides d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab et et l'héparine.

Les légendes

1. Oligosaccharides a concentration 200 ug/ml
2. Oligosaccharides a concentration 400 ug/ml
3. Oligosaccharides a concentration 600 ug/ml
4. Oligosaccharides a concentration 800 ug/ml
5. Oligosaccharides a concentration 1000 ug/ml
6. Le contrôle positive (l' héparine)
7. Le contrôle négative (sérum)
8. La surface de la lyse

La détermination du pouvoir de l'inhibition la voie alterne du complément par l'utilisation de la technique hémolytique fonctionnelle AP100 nous a permis d'obtenir les résultats suivants. Les oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des polysaccharides hydrosolubles d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae) ont inhibé la cascade hémolytique du complément et ont bloqué l'hémolyse des hématies de manière dose-dépendante où les pourcentages d'inhibition obtenus sont de l'ordre de 7.06%, 20.71%, 47.84% et 51.77%, 59.18% correspondant respectivement aux concentrations 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml, 1000µg/ml. Tandis que le contrôle positif, l'héparine qui a inhibé l'hémolyse avec une taux d'inhibition de 69.13% à la concentration de 1000µg/ml. Le taux d'inhibition de l'activation de la voie du complément par l'héparine semble relativement élevé que les oligosaccharides d'*Urginea noctiflora* avec la concentration 1000µg/ml.

Les érythrocytes humain sont riches en acide sialique a charge négative sont des activateur de la voie alternative de complément (Cartron et Rahuel, 1995) et l'utilisation du gel d'agarose et les érythrocytes humain dans l'expérimentation ; des activateurs aussi de la voie alterne du complément ; nous permet donc de confirmer que l'activité anti complément est due aux oligosaccharides.

Certaines caractéristiques chimiques comme une forte teneur en acide sialique ou en héparine renforcent l'affinité de H pour le C3b et confèrent un caractère non activateur à la surface considérée (Fischer et Kazatchkine, 1993). Le facteur H est une protéine plasmatique empêche l'activation du complément par la voie alterne (Farries, 2010). Il sert de cofacteur dans le clivage de C3b par le facteur I et il dissocie les convertases de la voie alterne. Plusieurs sites de liaison polyanioniques du facteur H dirigent ses activités régulatrices vers des surfaces qui portent des glycosaminoglycanes (GAG) et/ou de l'acide sialique (Farries et al., 1988). Le facteur H sera en compétition avec le facteur B pour le site de liaison au C3b. L'activité du facteur H dépend du contenu cellulaire en acide sialique. Ainsi, plus la concentration en acide sialique est élevée, plus l'activité du facteur H est élevée et moins le facteur B a d'affinité pour le C3b (Martel, 2009).

L'héparine a longtemps été reconnu comme un inhibiteur *in vitro* de l'activation du complément. Ses groupes sulfates jouent un rôle crucial dans cette inhibition. De nombreuses études ont valorisé l'importance de l'existence des groupements sulfates dans la structure chimique de l'héparine sur son activité anti-complément. En 1993, Sahu et Pangburn, ont examiné l'activité de liaison de la SHN sur héparine-agarose par chromatographie d'affinité. Ils ont trouvé que 13 protéines du complément (C1q, C2, C4, C4bp, C1INH, B, D, H, P, C6, C8, C9 et Vitronectine) se lient à l'héparine, tandis que neuf protéines du complément (C1r,

C1s, C3, FactorI, C5, C7, C3b, Ba et Bb) ne se lient pas à l'héparine. Et ont conclu que l'héparine inhibe l'activité du complément (Yu et al., 2005).

Des études antérieures ont montré que le poids moléculaire est un facteur important sur l'activité anti-complément (Xu et al, 2007), les teneurs relativement élevées en acide galacturonique sont aussi importantes pour l'inhibition du complément, et aussi la teneur en sulfate est importante pour l'activité anti-complément et son effet est influencé par les concentrations des échantillons (Cofrancesco et al., 1979). En outre les teneurs élevées en arabinose et en galactose ainsi que l'existence de structure ramifiées sont des exigences pour l'activité anti-complément (Samuelsen et al., 1996; Du et al., 2016). Les groupes carboxyles de GalA dans les polysaccharides acides affectent leurs pouvoirs d'inhibition et la réduction des carboxyles des polysaccharides peut considérablement diminuer leurs activités anti-complément (Kiyohara et al., 1988).

Le fragment à haut poids moléculaire de l'extrait brut des polysaccharides, obtenu de parenchyme des feuilles d'*Aloevera* (liliaceae), a montré une concentration inhibitrice CI50 de 110µg/ml (Hart et al., 1988) . Ces polysaccharides sont majoritairement constitués de mannose (Hart et al. 1988). L'analyse de la composition monosaccharidique des polysaccharides hydrosolubles issus des bulbes d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae) par HPAEC-PAD et par CG-MS/EI, révèle la présence de mannose 30,9%, glucose 54.3%, de galactose 14,9% et de traces de L-arabinose et d'acide D-glucuronique (Boual, 2014).

Les monocotylédones présentent des réserves de β -(1→4) glucomannanes dans les tissus végétatifs, en particulier dans les bulbes des Liliaceae. Les glucomannanes sont constitués d'une chaîne linéaire de mannoses et de glucoses, liées en β -(1→4) partiellement acétylées, avec une substitution de galactose en position C-6 des mannoses. Le rapport des unités mannose et glucose dans le polysaccharide, est d'environ 3:1, et la distribution des deux monomères est généralement aléatoire (Kurt et Kahyaoglu 2014).

A cet effet, l'activité anti-complément des oligosacchrides extrait a partir des bulbes d'*Urginea noctiflora* est due à la présence de mannose et le faible taux de l'acide glucuronique qui présente un effet néfaste sur l'activité anti-complément en réduisant le taux d'inhibition (Samuelsen et al., 1996).

Conclusion

Conclusion

La cascade hémolytique du complément est primordial dans la défense immunitaire innée et la régulation du processus inflammatoire. Elle demeure bénéfique pour l'hôte mais dans le cas de son activation d'une manière inappropriée ou excessive, elle peut contribuer au développement de diverses maladies auto immunes ou inflammatoires.

Pour cette raison, on a visé l'investigation de la capacité immuno-modulatrice que peuvent avoir les polysaccharides issus des plantes médicinales; qui ont des activités anti inflammatoire et anti complément puissantes ; vis-à-vis la première ligne de la réponse immunitaire innée, le système de complément en exprimant l'inhibition de leur activation via la voie alterne par l'utilisation de la technique hémolytique AP100. A cet effet notre travail s'intéresse à l'étude de l'activité anti-complément *in vitro* des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des polysaccharides hydrosolubles extraits à partir des bulbes d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab ; une plante spontanées à caractère médicinal de la famille de liliaceae .

Les résultats de cette étude de l'activité anti complément ; par la technique hémolytique AP100 ; des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des polysaccharides hydrosolubles issus de la plante *Urginea noctiflora* ont montré une efficacité notable vis-à-vis l'inhibition de la voie alterne du. Les oligosaccharides d'*Urginea noctiflora* ont donné un taux d'inhibition important de l'ordre de 59.18% à une concentration de 1000µg/ml en comparaison avec le contrôle positif l'héparine. Des études précédentes ont montré que les polysaccharides hydrosolubles d'*Urginea noctiflora* présentent des puissantes capacités de l'inhibition de la voie classique du complément, donc on peut conclure que les oligosaccharides d'*urginea noctiflora* peuvent être utilisés comme des inhibiteurs de l'activation du complément via voie alterne.

Par ces résultats intéressants obtenus, cette étude à apporté de nouvelles informations préliminaires concernant les propriétés immuno-modulatrice des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae). Cependant des études complémentaires approfondies sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de l'inhibition du cascade hémolytique du complément et de rapporté la relation structure-fonction des polysaccharides.

Nous espérons, avec nos résultats, avoir participé à la justification de l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales pour les traitements anti-inflammatoires.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Afroz, S. Hassan, M. A. (2008). Systematic studies in the family Liliaceae from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 15(2), 115-128.

Azizi, N. Amirouche, R. & Amirouche, N. (2016). Cytotaxonomic diversity of some medicinal species of Hyacinthaceae from Algeria. *Pharmacognosy Communications*, 6(1), 34.

Bauvois, A. Larivière, M. Watier, H. & Maillot, F. (2019). Actualités des anticorps monoclonaux dans les maladies monogéniques aujourd'hui. *médecine/sciences*, 35(12), 1026-1028.

Benaoune, F. (2017). Caractérisation structurale et potentiel biologique des polysaccharides issus de *Plantagonotata Lagasca* (Plantaginaceae) et *Urginea noctiflora* Batt. Trab (Liliaceae) (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne(2017-2020)).

Benmansour, N. C. Carvelli, J. & Vivier, É. (2021). Implication de la cascade du complément dans les formes sévères de COVID-19. *médecine/sciences*, 37(4), 333-341.

Boual, Z. (2014). Caractérisation physico-chimique des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara Septentrional Est algérien): Activité biologique (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Biochimie, Université Kasdi-Merbah de Ouargla, Algérie).

Boual, Z. Kemassi, A. Hamid Oudjana, A. Michaud, P. & Ould, E. H. M. (2011). Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malvaparviflora* l.(Malvaceae): activité prébiotique. *Lebanese Science Journal*, 14(2), 41-51.

Bouzidi, M.A. Latreche, A. Attaoui, I. Mehdadi, Z. Benyahia, M. Bouguenaya, N. & Meliani, H. (2010). Caractérisation et valorisation des polysaccharides pariétaux d'*Urginea pancration* (Steinh) Phil. de Djebel Tessala (Nord-Ouest Algérien). *Les Technologies de Laboratoire*, 5(19), 23-29.

Bozorgi, M. Amin, G. Kasebzade, S. & Shekarchi, M. (2016). Development and validation of a HPLC-UV method for determination of Proscillaridin A in *Drimia maritima*.

- Bruneton, J.** (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier.
- Cartron, J. P.** Rahuel, C. (1995). MNSs and major glycoproteins of human erythrocytes. *Transfusion clinique et biologique*, 2(4), 251-258.
- Chebira, M.** Boudjaadar, W. (2014). Contribution à la mise en évidence de nouveaux antis inflammatoires par docking moléculaire. *Biochimie moléculaire et sante*, 62(24), 1136-1148.
- Chouana, T.** (2017). Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bunge* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne(2017-2020)).
- Chun, H.** Shin, D. H. Hong, B. S. CHO, H. Y. & YANG, H. C. (2001). Purification and biological activity of acidic polysaccharide from leaves of *Thymus vulgaris* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(8), 941-946.
- Cofrancesco, E.** Radaelli, F. Pogliana, E. Amici, N. Torri, G. G. & Casu, B. (1979). Correlation of sulfate content and degree of carboxylation of heparin and related glycosaminoglycans with anticomplement activity. Relationships to the anticoagulant and platelet-aggregating activities. *Thrombosis Research*, 14(1), 179-187.
- Cofrancesco, E.** Radaelli, F. Pogliana, E. Amici, N. Torri, G. G. & Casu, B. (1979). Correlation of sulfate content and degree of carboxylation of heparin and related glycosaminoglycans with anticomplement activity. Relationships to the anticoagulant and platelet-aggregating activities. *Thrombosis Research*, 14(1), 179-187.
- Cofrancesco, E.** Radaelli, F. Pogliana, E., Amici, N. Torri, G. G. & Casu, B. (1979). Correlation of sulfate content and degree of carboxylation of heparin and related glycosaminoglycans with anticomplement activity. Relationships to the anticoagulant and platelet-aggregating activities. *Thrombosis Research*, 14(1), 179-187.
- Colliec S,** Breaudiere J, Patrick D, Fischer A.M, Jacqueline J, Bernard K, Vidal C, (1990). Polysaccharides sulfates, agent anticoagulant et agent anticomplementaire obtenus a partir de fucanes d'algues brunes et leur procédé d'obtention.
- Delbarre-Ladrat, C.** Sinquin, C., Lebellenger, L. Zykwiniska, A. & Colliec-Jouault, S. (2014). Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Frontiers in chemistry*, 2, 85.

Di Hong-Ye. Yy Zhang & Dao-Feng, C. H. E. N. (2013). Isolation of an anticomplementary polysaccharide from the root of *Bupleurum chinense* and identification of its targets in complement activation cascade. *Chinese journal of natural medicines*, 11(2), 177-184.

Dimopoulou, M. (2013). Les polysaccharides de la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, de l'élucidation de leurs structures et voies de biosynthèse à leur valorisation technologique (Doctoral dissertation, Bordeaux 2).

Dobó, J. Szakács, D. Oroszlán, G., Kortvely, E. Kiss, B., Boros, E, ...&Pál, G. (2016). MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.

Dou, C. Zhang, B. Han, M. Jin, X., Sun, L., & Li, T. (2017). Anti-tumor activity of polysaccharides extracted from *Senecioscandens* Buch.-Ham root on hepatocellular carcinoma. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(1), 43-49.

Dragon-Durey, M. A. Fremeaux-Bacchi, V. (2006). Déficits en protéines du complément en pathologie humaine. *La Presse Médicale*, 35(5), 861-870.

Dragon-Durey, M. A. Fremeaux-Bacchi, V. (2006). Déficits 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.

El-Seedi, H.R. Burman, R. Mansour, A. Turki, Z. Boulos, L. Gullbo, J. & Göransson, U. (2013). The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: discovery of an active cardiac glycoside from *Urginea maritima*. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(3), 746-757

Farries TC. Lachmann PJ, Harrison RA. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochem. J.* 1988;252:47-54.

Ferreira, V. P. Pangburn, M. K. & Cortés, C. (2010). Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Molecular immunology*, 47(13), 2187-2197.

Fischer, E. Kazatchkine, M. (1993). Rôle du complément dans la réaction inflammatoire. *Veterinary Research*, 24(4), 346-348.

Fishelson, Z. (1991). Complement C3: a molecular mosaic of binding sites. *Molecular immunology*, 28(4-5), 545-552.

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.

Gäckler, A. Dobronravov, V. La Manna, G. Denker, A., Liu, P. Schoenermarck, U. ... & Praga, M. (2020). MO020 Efficacy and safety of the long-acting C5 inhibitor ravulizumab in patients with postpartum atypical haemolyticuraemic syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 35(Supplement_3), gfaa140-MO020.

Ganju L, Karan D, Chanda S, Srivastava KK, Sawhney RC, Selvamurthy W. (2003). Immunomodulatory effects of agents of plant origin. *Biomed.Pharmacother.* 57: 296-300.

Garlatti, V. (2008). Systèmes effecteurs de l'immunité innée: reconnaissance et voies de signalisation (Doctoral dissertation, Grenoble 1).

Gasque, P. Chan, P. Mauger, C. Schouft, M. T. Singhrao, S., Dierich, M. P. ... & Fontaine, M. (1996). Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *The Journal of Immunology*, 156(6), 2247-2255.

Genestie, B. (2006). Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales: Approches méthodologiques (Doctoral dissertation).

Goetz P. Ghedira K. 2012. *Phytothérapie anti-infectieuse*. Universite de Monasti Springer-Verlag France, Paris. Pp216.

Guéguinou, N. Jeandel, J. Kaminski, S., Baatout, S. Ghislin, S. & Fripiat, J. P. (2019). Modulation of Iberian ribbed newt complement component C3 by stressors similar to those encountered during a stay onboard the International Space Station. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1579.

Halbwachs-Mecàrelli, L. Lesavre P. (1986) Le complément. In : Bach JF, ed. *Immunologie* 3e éd. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1986 : 345-7 1.

Hart L.A. Nibbering P.H. Van Den Barselaar M.TH. Van Dijk H. Van Den Berg A.J.J. et Labadie R.P. 1988- Effects of low molecular constituents from Aloe vera gel on oxidative metabolism and cytotoxic and bactericidal activities of human neutrophils. *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 12: 427-434.

- Hong-Ye, D. I. Zhang, Y. Y. & Dao-Feng, C. H. E. N. (2013). Isolation of an anti-complementary polysaccharide from the root of *Bupleurum chinense* and identification of its targets in complement activation cascade. *Chinese journal of natural medicines*, 11(2), 177-184.
- Huo, J. Lu, Y. Jiao, Y. & Chen, D. (2020). Structural characterization and anticomplement activity of an acidic polysaccharide from *Hedyotis diffusa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1553-1560.
- Ibrahim, M. A. Amin, M. A. Fetih, G. & Abou Ela, A. (2010). Formulation and evaluation of ketorolac tromethamine-Eudragit solid dispersions of potential sustained-release properties. *STP pharma pratiques*, 20(3), 189.
- Isenman, D. E. Kells, D. I. Cooper, N. R. Mueller-Eberhard, H. J. & Pangburn, M. K. (1981). Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry*, 20(15), 4458-4467.
- Kerepesi, L. A. Hess, J. A. Nolan, T. J., Schad, G. A. & Abraham, D. (2006). Complement component C3 is required for protective innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *The Journal of Immunology*, 176(7), 4315-4322.
- Kiyohara, H. Cyong, J. C. & Yamada, H. (1988). Structure and anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate research*, 182(2), 259-275.
- Koko, W. S. Mesaik, M. A. Yousaf, S. Galal, M. & Choudhary, M. I. (2008). In vitro immunomodulating properties of selected Sudanese medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 118(1), 26-34.
- Krenn, L. Kopp, B. (1998). Bufadienolides from animal and plant sources. *Phytochemistry*, 48(1), 1-29.
- Krenn, L. Hüfner, A. Kasthuber, A. & Speta, F. (2004). Chemotaxonomic relevance of cardenolides in *Urginea fugax*. *Phytochemistry*, 65(21), 2881-2884.
- Kulkarni, P. A. Afshar-Kharghan, V. (2008). Anticomplement therapy. *Biologics: targets & therapy*, 2(4), 671.
- Kurt A. Kahyaoglu T. 2014.- Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, vol.104: 50-58.

- Li, B. Xia, L., Deji, Zhu, M., Lu, Y. & Chen, D. (2019). Structural analysis and anticomplement activity of a novel homogenous polysaccharide isolated from Juniperustibeticakom. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 38(9), 552-565.
- Liu, Y. Fang, S. Zhou, M. Shang, X. Yang, W. & Fu, X. (2018). Geographic variation in water-soluble polysaccharide content and antioxidant activities of Cyclocaryapaliurus leaves. *Industrial Crops and Products*, 121, 180-186.
- Lutz, H. U. & Jelezarova, E. (2006). Complement amplification revisited. *Molecular immunology*, 43(1-2), 2-12.
- Markiewski, M. M. Lambris, J. D. (2007). The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *The American journal of pathology*, 171(3), 715-727.
- Martel, C. (2005). Activation du système du complément dans les syndromes coronariens aigus.
- Martel, C. (2009). Rôles physiopathologiques du complément dans le syndrome coronarien aigu et implications thérapeutiques.
- Morgan B. P. (2000) The complement system: an overview. *Complement methods and protocols*:1-13.
- Morgan, B. P. Harris, C. L. (2003). Complement therapeutics; history and current progress. *Molecular immunology*, 40(2-4), 159-170.
- Morgan, B. P. Serna, M. Giles, J. L. & Bubeck, D. (2016). Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nature communications*, 7(1), 1-7.
- Nie C, Zhu P, Ma S, Wang M, et Hu Y. (2018). Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce. *Carbohuydratebolymers*. Vol: 8617(18).
- Nordahl, E. A. Rydengård, V. Nyberg, P. Nitsche, D. P. Mörgelin, M. Malmsten, M. ... & Schmidtchen, A. (2004). Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(48), 16879-16884.
- Noris, M. Remuzzi, G. (2013, November). Overview of complement activation and regulation. In *Seminars in nephrology* (Vol. 33, No. 6, pp. 479-492). WB Saunders.

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

Passot, C. Sberro-Soussan, R. Bertrand, D. Caillard, S., Barbet, C. Schvart, B. ... & Gatault, P. (2017). Suivi thérapeutique pharmacologique de l'éculizumab: une étude multicentrique française. *Néphrologie & Thérapeutique*, 13(5), 278-279.

Praznik, W. & Spies, T. (1993). Fructo-oligosaccharides from *Urginea maritima*. *Carbohydrate Research*, 243(1), 91-97.

Pepis, MB. (1974). Role of complement in induction of anti bodies in vivo. Effect of cobra venom factor and other C3-reactive reagents on thymus-dependent and th us-inde endent an ti body response. *1 Exp Med* 1974 ; 1 40: 1 26-45.

Pretorius, E. Marx, J. Espag, W. J. & Bester, M. J. (2005). *Urginea sanguinea*: medicinal wonder or death in disguise?. *Environmental toxicology and pharmacology*, 20(1), 26-34.

Quézel, P. Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: Editions du Centre National de la recherche scientifique, 1170 p.

Quintrec, D. L. (2013). Facteurs prédictifs de récidence et de sévérité du syndrome hémolytique et urémique atypique et de la glomérulonéphrite à C3 après transplantation rénale (Doctoral dissertation, Paris 5).

Régis, D. Tissot, B. Place, C. & Gueroui, Z. (2006). Peigner de l'ADN pour étudier les interactions polysaccharide-protéine. *Actualite Chimique*, 297, 15.

Rioux, L. E. (2010). Caractérisation structurale et évaluation de l'activité biologique de polysaccharides extraits de *Saccharinalongicruris*.

Ripoche, J. Demares, M. J. Julien, N. Lemercier, C. Dauchel, H. Davrinche, C. ... & Fontaine, M. (1989). Les protéines régulatrices du système du complément.

Rondeau, E. Scully, M. Ariceta, G. Barbour, T. Cataland, S., Heyne, N. ... & Wong, E. K. (2021). Corrigendum to “Rondeau E, Scully M, Ariceta G, Barbour T, Cataland S, Heyne N, Miyakawa Y, Ortiz S, Swenson E, Vallee M, Yoon SS, Kavanagh D and Haller H; on behalf of the 311 Study Group. The long-acting C5 inhibitor, Ravulizumab, is effective and safe in adult patients with atypical hemolytic uremic syndrome naïve to complement inhibitor treatment.” *Kidney Int.* 2020; 97: 1287–1296. *Kidney International*, 99(5), 1244.

Rondeau, E. Scully, M., Ariceta, G. Barbour, T. Cataland, S. Heyne, N. ... & Wong, E. K. (2020). The long-acting C5 inhibitor, Ravulizumab, is effective and safe in adult patients with

atypical hemolytic uremic syndrome naïve to complement inhibitor treatment. *Kidney international*, 97(6), 1287-1296.

Rosain, J. Ngo, S., Bordereau, P. Poulain, N., Roncelin, S. Martins, P. V. ... &Frémeaux-Bacchi, V. (2014, May). Déficits en protéines du complément et pathologies humaines. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 72, No. 3, pp. 271-280).

Sahu, A. Panoburn, M. K. (1993). Identification of multiple sites of interaction between heparin and the complement system. *Molecular immunology*, 30(7), 679-684.

Samuelsen A.B. Paulsen B.S., Wold J.K. Otsuka H., Kiyohara H. Yamada H. et Knutsen S.H. 1996.- Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydrate polymer*, vol. 30: 37-44.

Samuelsen, A. B. Paulsen, B. S. Wold, J. K. Otsuka, H., Kiyohara, H. Yamada, H. &Knutsen, S. H. (1996). Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydrate polymers*, 30(1), 37-44.

Samuelsen, A. B. Paulsen, B. S. Wold, J. K., Otsuka, H. Kiyohara, H. Yamada, H. &Knutsen, S. H. (1996). Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydrate polymers*, 30(1), 37-44.

Samuelsen, A. Lund, I. Djahromi, J. Paulsen, B., Wold, J. &Knutsen, S. (1999). Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers*, 38(2), 133-143.

Sánchez, M. P. (2006). Polysaccharides ayant une activité immunomodulatrice chez les champignons indigènes du Québec.

Sayah, S. Leon, P. Chan, P., & Fontaine, M. (1998). Les récepteurs des anaphylatoxines C3a (C3aR) et C5a (C5aR).

Serna, M. Giles, J. L. Morgan, B. P. &Bubeck, D. (2016).Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nature communications*, 7(1), 1-7.

Serna, M. Giles, J. L., Morgan, B. P. &Bubeck, D. (2016). Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nature communications*, 7(1), 1-7.

Servais, A. Hummel, A. & Legendre, C. (2014). Syndrome hémolytique et urémique atypique: pour qui l'éculizumab?.*Réanimation*, 23(6), 645-652.

Sharaf, A.M. Elhaw, M.H. &Kassem, N.N. (2017). Separation and Identification Main Polyphenolic Compounds from *Urginea undulata*. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3, 31-36.

Sinquin C. Colliec-jouault S. (2014). Les polysaccharides marines et leurs application dans le domaine de la santé. Vol : 50(9). P : 2964-2970.

Spies, T. Praznik, W. Hofinger, A. Altmann, F. Nitsch, E. & Wutka, R. (1992). The structure of the fructan sinistrin from *Urginea maritima*. *Carbohydrate Research*, 235, 221-230.

Spitzer, D. Mitchell, L. M., Atkinson, J. P. &Hourcade, D. E. (2007).Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *The Journal of Immunology*, 179(4), 2600-2608.

Tanaka, K. Adams, B. Aris, A. M. Fujita, N., Ogawa, M., Ortiz, S. ... &Greenbaum, L. A. (2021). The long-acting C5 inhibitor, ravulizumab, is efficacious and safe in pediatric patients with atypical hemolytic uremic syndrome previously treated with eculizumab. *Pediatric Nephrology*, 36(4), 889-898.

Théo E. & Christian N. (2008). Analyse des polysaccharides.

Thuong, P. T. Min, B. S. Jin, W. Na, M. Lee, J. Seong, R. ... & Kang, S. S. (2006). Anti-complementary activity of ursane-type triterpenoids from *Weigela subsessilis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 830-833.

Tomoda, M. Miyamoto, H. & Shimizu, N. (1994).Structural features and anti-complementary activity of rehmanna SA, a polysaccharide from the root of *Rehmanniaglutinosa*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 42(8), 1666-1668.

Volanakis, J. E. Arlaud, G. J. (1998). Complement enzymes. The human complement system in health and disease, 49.

Walport MJ. Complement. Second of two parts. *The New England journal of medicine*.(2001) 344(15) 1140 1144.

Walport, M. J. (2001). Complement: first of two parts. *N Engl J Med*, 344, 1058-1066.

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 GlycomLipidom* 2:1-8. JeongJeong 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.

Weihua, J. Fang, Q. Jiang, D. Li T., Wei, B. Sun, J., ...&Zhong, W. (2020). Structural characteristics and anti-complement activities of polysaccharides from *Sargassumhemiphyllum*. *Glycoconjugate Journal*, 37(5), 553-563.

Weill, B. Batteux, F. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur.

Wilmet, M. (1970). Le système de l'indicatif en moyen français: étude des " tiroirs" de l'indicatif dans les farces, sotties et moralités françaises des XVe et XVIe siècles (Vol. 210). Librairie Droz.

Xia L, Zhu M, Chen D, Lu Y. 2020. *Juniperuspingii* 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 *Bupleurumsmithii*. *International immunopharmacology*, 7(2), 175-182.

Yang, L. Zhang, L. M. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate polymers*, 76(3), 349-361.

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, E. M. Edens, R. E. & Linhardt, R. J. (2005). Heparin regulation of the complement system. In *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate* (pp. 313-343). Elsevier Science.

Zhang W, Jin W, Sun D, Zhao L, Wang J, Duan D, Zhang Q. (2015) Structural analysis and anti-complement activity of polysaccharides from *Kjellmaniellacrsaifolia*. *Marine drugs* 13(3):1360-1374.

Zhang, T. Chen, D. (2008). Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS. *Journal of ethnopharmacology*, 117(2), 351-361.



Zhou HF, Xie C, Jian C, Kang J, Li Y, Zhuang CL, Yang F, Zhang LL, Lai L, Wu T, Wu X. (2011). Biflavonoids from caper (*Capparis spinosa* L.) fruits and their effects in inhibiting NF-kappa B activation. *J. Agric. Food Chem.* 59: 3060-3065.

Zong, A. Cao, H. & Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate polymers*, 90(4), 1395-1410.

Annexes

Annexes

Tableau 1 : Calcul des pourcentage d' inhibition pour les échantillons de chaque dilution

Expérience 1		Moyenne de diamètre (D)	Rayon (r)	Surface d'hémolyse	Hémolyse %	Inhibition %
Contrôle négatif		1.4	0.7	1.5386	100	0
Contrôle positif		0.8	0.4	0.5024	32.65	67.35
Oligosaccharides μg/ml	200	1.35	0.675	1.43	92.94	7.06
	400	1.25	0.625	1.22	79.29	20.71
	600	1.15	0.557	1.03	67.47	32.53
	800	1.05	0.525	0.865	56.25	43.53
	1000	0.95	0.475	0.7084	46.04	53.96

Tableau 2 : Calcul des pourcentage d' inhibition pour les échantillons de chaque dilution

Expérience 2		Moyenne de diamètre (D)	Rayon (r)	Surface d'hémolyse	Hémolyse %	Inhibition %
Contrôle négatif		1.8	0.9	2.5434	100	0
Contrôle positif		1	0.5	0.785	30.86	69.13
Oligosaccharides μg/ml	200	/	/	/	/	/
	400	/	/	/	/	/
	600	1.3	0.69	1.32	52.16	47.84
	800	1.25	0.625	1.22	48.23	51.77
	1000	1.15	0.575	1.0381	40.81	59.18

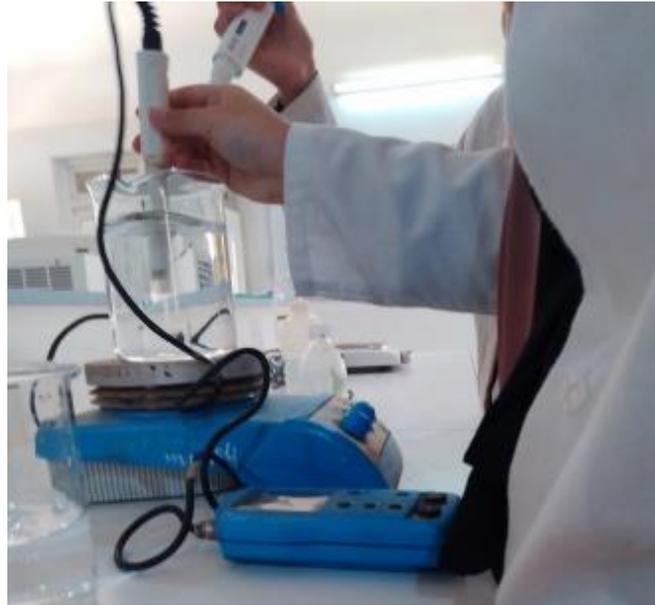


Figure 1 : Ajustement de pH des solutions tampon.



Figure 2 : Tampons : MgCl₂, PBS, ACP, EGTA.



Figure 3 : Hydrolyse acide partielle des polysaccharides *d'Urginea noctiflora* par l'acide tri-fluoro-acétique (TFA).



Figure 4 : Evaporation de TFA des hydrolysats sous la hotte par le méthanol.

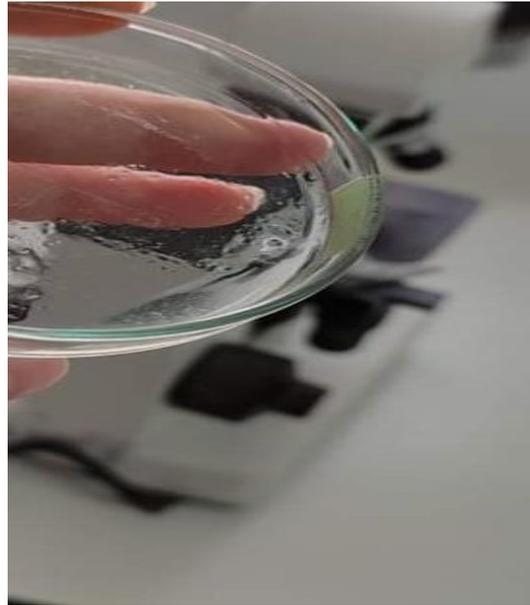


Figure 5 : Récupération des hydrolysats après l'évaporation de TFA par l'eau ultra-pure.

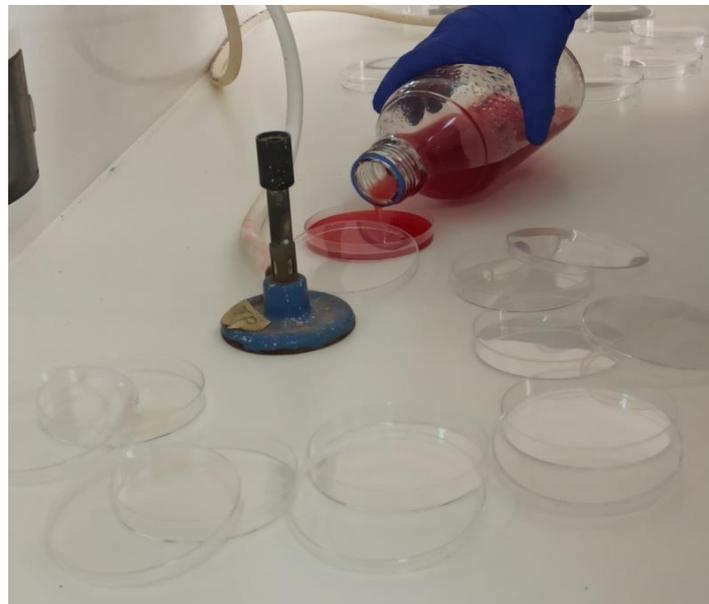


Figure 6 : Versement du mélange agarose-hématies dans les boites.



Figure 7 : Refroidissement des boîtes AP100 (Gel fondu + ACP+ hématies).

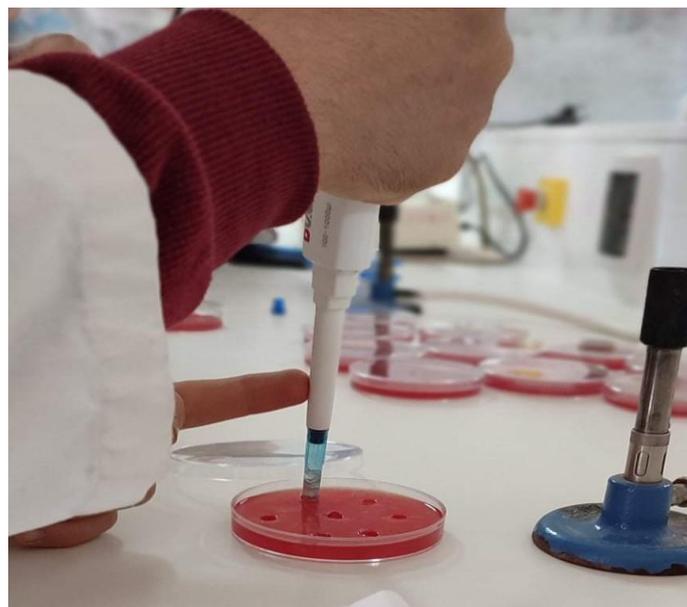


Figure 8 : Formation des puits dans les boîtes.



Figure 9 : Ajout des mélanges réactionnels dans les puits des boîtes du test hémolytique AP100.



Figure 10 : Zones de lyse des hématies par le complément (SHN).

Résumé

Ce travail vise l'activité anti-complément des Oligosaccharides issus des polysaccharides hydrosolubles des bulbes d'une plante spontanée à caractère médicinal ; *Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae). Le test anti-hémolytique via la technique AP100 ; avec des boîtes de Pétri contenant du gel d'agarose et des hématies ; à pour objectif de déterminer la concentration des oligosaccharides inhibitrice de 100% de l'hémolyse causée par l'activation de la voie alterne du complément présent dans le sérum humain normal. Les résultats ont montré que, les oligosaccharides d'*Urginea noctiflora* inhibent complément d'une manière dose-dépendante. Où ils inhibent 59,18% de l'activation de la voie alterne à une concentration 1000µg/ml tandis que l'héparine ; un oligosaccharide sulfaté utilisé comme contrôle positif ; avec la même concentration a provoqué une inhibition de 69,13%. La comparaison de ces résultats avec des études antérieures qui ont montré que les oligosaccharides présentent des forts pouvoirs inhibitrices du complément nous permet de justifier l'utilisation traditionnelle de notre plante et de conclure que les polysaccharides issus d'*Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae) peuvent être utilisés dans les traitements anti-inflammatoires comme des inhibiteurs du complément.

Mots clés : *Urginea noctiflora* , Oligosaccharides, hémolyse, AP100, Voie alterne.

ملخص

السكريات المستخرجة من النباتات الطبية لها أنشطة بيولوجية مختلفة مثل النشاط المضاد للالتهابات و النشاط المضاد للمتمم. يركز عملنا على دراسة تثبيط نشاط المتمم بواسطة السكريات القابلة للذوبان في الماء (polysaccharides hydrosolubles) المستخلصة من درنة نبتة بصيص الفار *Urginea noctiflora* ، وهي نبتة ذات ميزة طبية من عائلة (Liliaceae)، يعتمد اختبار AP100 على قياس معدل تثبيط مسار المتمم بواسطة أجزاء من السكريات القابلة للذوبان في الماء 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 polysaccharides و تخفيف بنسبة 6:1 من المصل البشري الطبيعي المستعمل كمصدر للمتمم وتركيز 1000 ميكروغرام / مل من héparine ، وهو متعدد السكريات الكبريتية المستخدمة كاختبار إيجابي ؛ تمت مقارنة تثبيط نشاط المتمم لل oligosaccharides مع نشاط تثبيط héparine ، oligosaccharides بتركيز 1000 ميكروغرام / مل يعطي معدل تثبيط يعادل 59,18 وهو قريب من معدل تثبيط 69,13% في نفس التركيز ؛ هذه النتائج أظهرت أن متعدد السكريات المستخلص من درنة نبتة بصيص الفار له نشاط مهم مضاد للمتمم ، ويمكن يمكن استخدامه لعلاج الالتهابات كمثبط للمتمم.

الكلمات المفتاحية: بصيص الفار، متعدد السكريات، انحلال خلايا الدم، تقنية AP100، Voie alterne.

Abstract

Urginea noctiflora Batt & Trab (Liliaceae) is a spontaneous plant used in folk medicine for treatment of medical disorders. The aim of this present work was devoted to the anti-complement activity of Oligosaccharides obtained by partial hydrolysis of water-soluble polysaccharides obtained from the seeds of *Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae). Exploration of the anti-complement test using the AP100 hemolytic technique; using Petri dishes containing agarose gel and erythrocytes; consists in determining the concentration of oligosaccharides able to inhibiting 100% lysis of red blood cells caused by the activation of the alternative pathway of complement contained in normal human serum. The results suggest that, *Urginea noctiflora* polysaccharides possesses dose-dependent anti-complement activity. Polysaccharide inhibits 59,18% of the activation of the alternative complement pathway presented by lysis of red blood cells at a concentration of 1000µg/ml while heparin; a sulfated oligosaccharide used as a positive control; shows an inhibition rate of 69,13% with the same concentration. These results are compared with previous studies which have shown that polysaccharides exhibit potent anti-complement activities therefore it can be concluded that the polysaccharide of *Urginea noctiflora* Batt & Trab (Liliaceae) can be used as a therapeutic inhibitor of the alternative complement pathway.

Keywords: *Urginea noctiflora*, Oligosaccharides, Hémolyse, AP100, Voie alterne.