

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 :

LAMOURI Chaima et SADOUKI Yasmine

**Activité Immuno-modulatrice des Polysaccharides isolés des
Graines de *Lepidium sativum* L.**

Soutenu publiquement

Le : 19/06/2022

Devant le jury :

Président	OULD EL HADJ KHELLIL Aminata	Pr	Univ. Ouargla
Encadrant	BENAOUN Fatima	MCB	Univ. Ouargla
Co-Encadrant	BOUAL Zakaria	Pr	Univ. Ouargla
Examineur	Telli Alia	MCB	Univ. Ouargla

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout Puissant de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Nos profonds remerciements vont particulièrement à notre directrice de ce mémoire de master **Mlle. 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 grande disponibilité, sa gentillesse, sa patience, sa confiance qu'il nous a témoignés et surtout pour ses précieux conseils accordés tout au long de la période de réalisation 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 gratifier aussi les membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail. **Mme. 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.

Mme. 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-Onargla 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.

Nos remerciements à tous nos enseignants et enseignantes durant les cinq ans d'étude universitaire. Enfin, on adresse nos sincères sentiments de gratitude et de reconnaissance à nos familles, nos amis et toute personne qui a, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace



Je tiens c'est avec grande plaisir que je dédie ce modeste travail

*à mes chères parents surtout à ma maman la lumière qui m'a toujours éclairée
mon chemin durant ces années d'études, à celle qui a tous fais pour ma réussite,
par sa tendresse , ses sacrifices et ses prières.*

*À mes précieuses chères amies qui n'ont jamais cessé d'être à mes côtés durant les
moments difficiles pour m'encourager et m'aider :*

mon binôme et mon amie de travail Yasmine , Marwa , Rawan et Rayane

À mon futur mari et mes futurs enfants

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

Chaima



Dédicace



Je suis très fier de dédier ce modeste travail

À mes chers parents,

À mon père qui m'a soutenu, orienté, guidé vers le bon chemin tout au long de ma vie afin de me voir arriver à ce stade.

À ma raison de présence, ma mère à qui je ne peux exprimer avec les mots toute ma reconnaissance pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Que Dieu les protège.

À mes sœurs et frères

à mon amie de travail Chaima

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

Yasmine





Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Abréviations	
Liste des figures	I
Liste des tableaux	2
Introduction	1

Synthèse bibliographique

I.- Lepidium Sativum L.....	2
I.1.- Généralités	2
I.2.- Utilisation thérapeutique.....	3
I.3.- Toxicité.....	3
I.4.- Activités pharmacologiques	3
I.4.1.- Activité anti-inflammatoire	3
I.4.2.- Activité hépato-protectrice	4
I.4.3.- Activité chimio-protectrice.....	4
I.4.4.- Activité immunomodulatrice	5
II.- Système du complément.....	5
II.1.- Définition	5
II.2.- Rôle biologique	6
II.2.1.- Inflammation et anaphylatoxie.....	6
II.2.2.- Opsonisation et lyse cellulaire.....	7
II.3.- Voies d'activation	7
II.3.1.- Voie classique	7
II.3.2.- Voie alterne	8
II.3.3.- Voie des lectines (MBL)	9
II.3.4.- Voie finale commune	10
II.4.- Déficits en protéines du cascade hémolytique	10
II.5.- Traitements disponibles.....	11
II.5.1.- L'éculizumab.....	11
II.5.2.- Le ravulizumab.....	11
III.- Bio-activités des polysaccharides	12
III.1.- Activité anti-inflammatoire.....	12
III.1.1.- Généralités sur l'inflammation	12



III.1.2.- Mécanismes de l'activité anti inflammatoire 13
III.2.- Activité anti-complément..... 15
III.2.1.- Rôle du complément dans l'inflammation 15
III.2.1.- Mécanismes de l'activité anti-complément 15

Methodologie

II.1.- Matériel d'étude 19
II.1.1.- Réactifs..... 19
II.1.1.1.- Tampons utilisés..... 19
II.1.1.1.1.- Tampon de la voie alterne 19
II.1.1.1.2.- Tampon phosphate saline 19
II.1.2.- Matériel biologique 23
II.1.2.1.- Extraction des polysaccharides hydrosolubles 23
II.1.2.2.- Obtention des oligosaccharides 23
II.1.2.3.- Prélèvement du sang..... 25
II.2.- Méthodes d'étude du test anti-complément AP100 25
II.2.1.- Préparation des hématies et sérum 25
II.2.2.- Préparation de solution mère et dilution des oligosaccharides et de l'héparine..... 26
II.2.3.- Préparation des boites du test 26
II.2.4.- Test anti-complément AP100..... 28
II.2.4.1.- Pré-incubation 28
II.2.4.2.- Incubation..... 28
II.2.5.- Calcul 32

Résultats et discussion

III.1.- Rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles..... 33
III.2.- Activité anti-complément des oligosaccharides ; Test AP100 33
Conclusion..... 36
Annexes 44

Abréviations

A

ACP: Alternative Complement Pathway

ASP: Aspartate amino transférase

ALT: Alanine amino transférase

C

C1: Complement component 1

CCl₄: Tétrachlorure de carbone

CAM: Complexe attaque membranaire

C5b: Forme protéolytiquement activée de C5

C3b: Forme protéolytiquement activée de C3

C5b-9: Complexe de composants terminaux de C5

CRP: C-reactive-protein

C4b : Forme protéolytiquement activée de C4

CD: Cellules dendritiques

D

D3-S1: Polysaccharide acide homogèneramifié

E

EGTA: Ethylène glycol-bis (-aminoéthyléther) N,N'-tétraacétique

G

Gal: Galactose

Glc: Glucose

GT: Glucotopéoline

GATA 3: Bindingprotien 3

G-CSF: Facteur de stimulation des colonies de granulocytes

H

HPN: Hémoglobinurie paroxystique nocturne

HBs: Antigène de virus B de l'hépatite

I

IgE: Immunoglobuline de classe E

IgG: Immunoglobuline de classe G

IgM: Immunoglobuline de classe M

IG: Benzylisothocytate BITC

ROS: Espèces réactives de l'oxygène

IFN: Interférons

K

KH₂PO₄: Dihydrogénophosphate de potassium anhydre

KCL: Chlorure de potassium

KC: kératinocytes

L

LPS: Lipopolysaccharide

M

MgCl₂ 6H₂O: Chlorure de magnésium Hydraté

MAPK: Protéine kinase activée

MCP-1: Macrophage chimiottractant phagocyte 1

MIP-1: Macrophage protéine inflammatoire 1

MIP-2: Protéine inhibitrice des macrophages

MMP: Métalloprotéinase matricielle

N

NaCl: Chlorure de sodium

Na₂HPO₄: D'Hydrogénophosphatedisodique anhydre

P

PBS: Solution saline tamponnée de phosphate

S

SC: Système du complément

SHN: Sérum humain normal

SHU: Syndrome atypique hémolytique et urémique

T

TFA: Acide tri-fluoro-acétique

TNF: Facteur de nécrose tumorale

Q

QI: 2-amino-3-méthyl imidazo quinoléine

U

UDPG: Glucosyltransférase

Liste des figures

Figures	Noms des figures	Pages
Figure 1:	<i>Lepidium sativum</i> L (Sruthi et al., 2017) .	2
Figure 2:	Graines de <i>Lepidium sativum</i> L	2
Figure 3:	Mécanismes d'activation de système du complément (Daugan et al.,2017).	6
Figure 4 :	Place des protéines de régulation dans les deux voies d'activation du système du complément (Leonardi et al.,2022).	8
Figure 5:	Boucle d'initiation du complément (Daugan et al., 2017).	9
Figure 6:	Composition moléculaire des C3/C5 convertases (Daugan et al., 2017).	9
Figure 7:	Mécanisme d'action de l'eculizumab (Soliris®) (Chevallier, 2018).	12
Figure 8:	Une réponse immunitaire inflammatoire excessive (Jin et al., 2020)	13
Figure 9:	Régulation du système immunitaire par les polysaccharides (Jin et al., 2020)	14
Figure 10:	Schéma de différentes étapes de l'extraction des polysaccharides hydrosolubles (Benaoun et al., 2017; Chouana et al., 2017).	Erreur ! Signet non défini.
Figure 11:	Schéma de différentes étapes de préparation des boîte AP100.	30
Figure 12:	Pourcentages de l'inhibition de l'hémolyse par la cascade hémolytique du complément en présence des oligosaccharides et l'héparine ; contrôle positif.	34
Figure 13:	Test hémolytique (anti-complément) AP100 des Oligosaccharides de <i>Lepidium sativum</i> L.	34

Liste des tableaux

Tableaux	Noms des tableaux	Page
Tableau 1 :	Déficiences en complément et pathologies associées(Rosain et <i>al.</i> , 2014)	10
Tableau 2 :	Activité anti-complément des polysaccharides.	17
Tableau 3 :	Appareils utilisés au cours de l'expérimentation.	20
Tableau 4 :	Caractéristiques des produits chimiques utilisés.	21
Tableau 5 :	Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation	22
Tableau 6:	Méthode de dilution des oligosaccharides de <i>Lepidium sativum</i> L (Brassicaceae).....	26
Tableau 7 :	Position systématique et usages thérapeutiques de la plante <i>Lepidiumsativum</i> L(Brassicaceae)	27
Tableau 8 :	Classification de <i>Lepidiumsativum</i> L (Brassicaceae).....	27
Tableau 9 :	Test anti-complément AP100 (7puits pour chaque boîte Pétri)	31
Tableau 10 :	Propriétés de l'extrait des graines de <i>Lepidium sativum</i> L	33

Introduction

Introduction

L'activité immuno-modulatrice est l'une des principales activités biologiques des polysaccharides naturels obtenus à partir de plantes médicinales, dont il a été rapporté qu'ils présentent une activité anti-complément *in vitro* (Labro, 2006).

Le système du complément est un composant essentiel de l'immunité innée et l'un des plus anciens mécanismes de défense contre les infections. Il est constitué de plus de 30 protéines ; les régulateurs intervenant sur le système du complément peuvent être solubles, comme le C1 neutralisant, le facteur I et le facteur H, ou membranaires, comme le CD35 (Le récepteur de complément de type 1, CR1), le CD46 (Protéine de cofacteur membranaire, MCP), le CD55 (Facteur accélérant le déclin, DAF), ce système peut être activé en cascade hémolytique selon trois voies d'activation (Daugen et al.,2017). Dans certains cas le complément peut avoir un dysfonctionnement et traduis par une hyper activité, cela entraîne des troubles de l'auto-immunité (Martel, 2005). Pour cette raison, l'inhibition du complément est une stratégie pour traiter ces maladies.

Différents inhibiteurs du complément ont été développés pour inhiber les différents composants de la cascade hémolytique de ce dernier (Vaisar, 2007), telles que les produits végétaux, comme les polysaccharides, qui sont des importants effecteurs biologiques, en raison de leurs diverses activités biologiques et de leurs effets secondaires négligeables (Leonardi et al.,2022). Donc cette étude vise l'activité anti-complément des oligosaccharides obtenus par hydrolyse acide partielle de polysaccharides isolés de *Lepidium sativum L.*, également connu sous le nom de Cresson alénois (Wadhwa et al.,2012).

La capacité immuno-modulatrice *in vitro* des oligosaccharides isolées des graines de *Lepidium sativum L.* (Brassicaceae) est exprimé via le test AP100 par l'inhibition de la voie alterne du complément ou bien l'inhibition de la lyse des hématies par le sérum humain normal ; source des protéines du complément ; en présence des oligosaccharides et l'héparine comme contrôle positif

Ce travail est organisé en 3 chapitres où le premier chapitre traite la synthèse bibliographique montrant le système du complément, le rôle, les différentes voies d'activation , les maladies évoluées en cas de leur dysfonctionnements et les médicaments à activité anti-complément, en passant par une description botanique générale de l'espèce étudié, l'utilisation thérapeutique, la toxicité, l'activité pharmacologique et à la fin, nous montrons les activités biologiques des polysaccharides. Le second chapitre, aborde l'une des techniques de détection de l'activité anti-complément *in vitro*, qui consiste à déterminer la concentration inhibitrice des oligosaccharides capable d'inhiber 100% de la lyse des hématies par le sérum humain normale (AP100). Le troisième chapitre présente les principaux résultats



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

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.- *Lepidium Sativum* L

I.1.- Généralités

Lepidium sativum populairement connu sous le nom de cresson alénois dans différentes régions du monde est une herbe annuelle comestible et à croissance rapide appartenant à la famille des Brassicaceae et au genre *Lepidium* (Aqafarini *et al.*, 2019). Cette plante herbacée, dressée, de couleur plus ou moins glauque possède une tige glabre, finement striée, profusément ramifiée et pousse jusqu'à 50 - 80 cm d'hauteur (Wadhwa *et al.*, 2012).

Elle fait partie des plantes médicinales, elle est utilisée pour traiter les troubles hyperactifs des voies respiratoires comme l'asthme, la bronchite et la toux (Maheswari *et Dewangan*, 2022). Son nom commun anglais est Garden cress et connu sous le nom de Hab Al-Rashad en Afrique du Nord (El-Heggar *et al.*, 2021). Les graines de *Lepidium sativum* contiennent des substances extrêmement nutritives avec un arôme et une saveur agréables ainsi que des minéraux, des vitamines et des métabolites importants, tels que complexes de glycoprotéines et des polysaccharides (Fahami *et Fathi*, 2018).



Figure 1: *Lepidium sativum* L (Sruthi *et al.*, 2017).



Figure 2: Graines de *Lepidium sativum* L

I.2.- Utilisation thérapeutique

Lepidium sativum Linn (cresson alénois) révèle être l'une des plantes médicinales les plus utilisées. Il trouve sa place dans la médecine traditionnelle. Des efforts considérables ont été faits pour vérifier sa efficacité en tant qu'agent curatif par le biais d'investigations pharmacologiques et d'essais cliniques (Mali et al.,2007).

A cet effet la demande croissante des consommateurs pour des produits alimentaires offrant des avantages pour la santé a initié plusieurs développements de produits de boulangerie contenant des ingrédients bioactifs tels que les graines de *Lepidium Sativum* L. Il est prouvé que la formulation fonctionnelle du produit en remplaçant ou en ajoutant certains ingrédients favorise les effets sur la santé, tels que les propriétés antidiabétiques, anticancéreuses, antioxydantes et anti-inflammatoires (Bhat et al., 2020).

Les graines bouillies sont consommées dans les boissons, soit moulues dans du miel, soit en infusion dans du lait chaud. En Afrique, les graines sont principalement utilisées en médecine pour le traitement de diverses maladies tel que l'asthme, la bronchite, la dysenterie, la pneumonie et les maux d'estomac (Wadhwa et al.,2012). Les graines du *L. sativum* sont aussi réputées diurétiques et recommandées dans l'inflammation, les rhumatismes et douleurs musculaires (Wiar, 2006). Elles sont répertoriées comme médicament utile pour les blessures, maladies de la peau et des yeux (Mali et al., 2007).

I.3.- Toxicité

Là il y a très peu de rapports dans la littérature concernant la sécurité des semences GC à usage alimentaire. Une étude de toxicité sur les graines de *L. sativum* chez des rats albinos Wistar pendant 6 semaines s'est avéré non toxique à 2 %, mais toxique à 10 % (p/p) (Adam 1999).

De même, Bafeel et Ali 2009 ont rapporté une toxicité hépatique chez des rats nourris avec une suspension d'extrait de graines de *L. sativum* à 2,0, 4,0 et 8,0 g/100/mL. Ils ont observé une diminution significative du poids corporel, des modifications histologiques du foie et augmentation des taux sériques d'ALP et d'ALT après 6 semaines d'alimentation avec une suspension de graines de *L. sativum* à 4 et 8 g/kg b.wt. ou 100, 200 et 400 mg/kg de poids corporel (Datta et al., 2011).

I.4.- Activités pharmacologiques

I.4.1.- Activité anti-inflammatoire

Les extraits de feuilles et de graines ont un effet anti-inflammatoire. La présence de glucosinolates et glycosides contribuent à cet effet. Des graines meurtries mélangées à du jus de citron vert peuvent être utilisées localement pour réduire l'inflammation et les douleurs rhumatismales (Gruffat, 2019). L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été basée sur

L'estimation de l'œdème de la patte des souris induit par la Carragénine. La Carragénine est un produit naturel qui provoque l'inflammation locale lorsqu'il est injecté dans l'aponévrose de la plante du pied elle induit un maximum d'œdème à partir de la 3^{ème} heure qui suit son injection (Itou et al., 2014). L'extrait testé a produit une activité anti-inflammatoire modérée. L'effet anti-inflammatoire de l'extrait hydro-méthanolique des graines de *Lepidium sativum* est observé à partir de là 3^{ème} heure. Des études antérieures ont montré aussi les effets anti-inflammatoires des graines de *Lepidium sativum* L (Nita et al., 2013).

I.4.2.- Activité hépto-protectrice

Les extraits de graines de *Lepidium sativum* ont démontré des effets hépto-protecteurs contre les lésions hépatiques induites par CCl₄. Une étude sur des rats wistar a démontré une diminution significative de l'hépatotoxicité et des dommages induits par CCl₄ lors du mélange de 200 à 400 mg / kg d'extrait de graines avec une alimentation quotidienne. 20 rats ont été divisés en 3 groupes (groupe témoin, groupe avec dommages au foie induits par CCl₄ et dommages au foie induits par CCl₄ traités avec l'extrait de graines de *lepidium sativum*) (Aouadhi, 2022). Après 10 jours, le taux sérique d'ASP (aspartate amino transférase), les taux d'ALT (alanine amino transférees) et la concentration de bilirubine étaient significativement plus élevés dans les groupes avec lésions hépatiques induites par CCl₄. Cependant, une diminution significative de ces paramètres dans le groupe traité avec des extraits de graines de *Lepidium sativum* a été observée. La raison de cet effet hépto-protecteur est due l'extrait de graines de *lepidium sativum* qui induit un effet antioxydant et une diminution de la formation de radicaux libres à partir de CCl₄, qui est le principal déclencheur de l'hépatotoxicité (Aouadhi, 2022).

I.4.3.- Activité chimio-protectrice

Lepidium Sativum a été étudié pour ses propriétés chimioprotectrices vis-à-vis des effets génotoxiques du 2- amino-3-méthyl imidazo quinoléine (QI) et de la réduction des lésions périplasiques coliques. Les médiateurs de ces effets protecteurs sont certains composés d'extrait de *lepidium sativum*, de la glucotropétoline (GT) et un produit de dégradation de l'IG (benzylisothocytate BITC) (Aouadhi, 2022). Les résultats étaient significativement positifs. Les dommages à l'ADN induits par le QI dans les cellules du côlon et du foie chez les rats F344 ont été réduits de 75% à 92%. Il est suggéré que cet effet chimio-protecteur est médié par la glucosyltransférase (UDPG) qui est une enzyme clé dans la détoxification du QI (Aouadhi, 2022).

I.4.4.- Activité immunomodulatrice

Les neutrophiles font partie des réponses immunitaires à médiation cellulaire responsables de l'immunité innée qui contribuent à l'élimination des corps étrangers par reconnaissance et migration vers le corps étranger, phagocytose et destruction de l'agent étranger. La propriété d'adhérence cellulaire des neutrophiles est l'une des premières réponses aux lésions immunologiques et physiques.

Dans le test d'adhérence des neutrophiles, la propriété d'adhérence cellulaire des neutrophiles a été évaluée dans des échantillons de sang de différents groupes en présence des extraits de *Lepidium sativum* Linn. Les extraits augmentent l'adhérence des neutrophiles (Bhupal, 2020). L'adhérence des neutrophiles est maximale pour l'extrait méthanolique et minimale pour l'extrait chloroformique. La comparaison de l'étalon avec l'extrait méthanolique à haute dose (500 mg/kg) ce qui était une indication de l'augmentation de la migration des neutrophiles vers les corps étrangers (Bhupal, 2020).

II.- Système du complément

II.1.- Définition

Le système du complément (SC) a été découvert à la fin des années 1890. Il est alors décrit comme un composant thermolabile du sérum, qui possède des propriétés antimicrobiennes, capable de compléter l'action des anticorps (Daugan et al., 2017). Depuis, les connaissances ont évolué et il est désormais établi que ce système fait partie intégrante du système immunitaire inné. Le SC fait référence à un ensemble de protéines sériques qui jouent un rôle primordial dans l'immunité innée ; elles permettent à l'hôte de se défendre contre les pathogènes et participent à l'élimination de ses propres cellules en condition d'apoptose (Daugan et al., 2017).

Il consiste en un réseau étroitement régulé de protéines plasmatiques ou membranaires qui jouent un rôle important dans la défense de l'hôte et l'inflammation (Sarma et Ward, 2011). Les protéines du complément représentent environ 5% des globulines plasmatiques. Ce sont des pro-enzymes inactives et qui sont activées en cascade par clivage. Le clivage libère une fraction ayant une activité enzymatique de protéase, et un petit fragment qui possède souvent un rôle sur les cellules inflammatoires (Daugan et al., 2017). Le système du complément peut être activé par trois voies différentes, l'activation du complément entraîne l'opsonisation des agents pathogènes et leur élimination par les phagocytes, ainsi que la lyse cellulaire (Sarma et Ward, 2011).

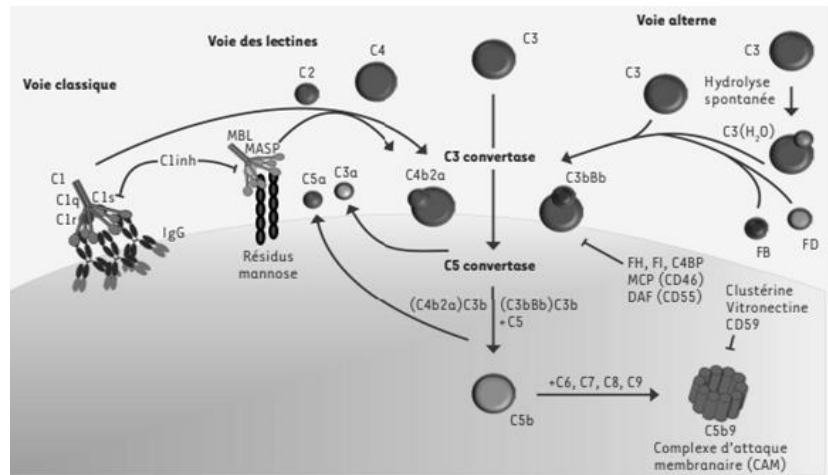


Figure 3: Mécanismes d'activation de système du complément (Daugan *et al.*,2017).

II.2.- Rôle biologique

Le système du complément joue un rôle essentiel dans les réponses immunitaires innées et adaptatives (Sarma *et Ward*,2011). Toute dérégulation de ce système peut perturber la défense normale de l'hôte et altérer la réponse inflammatoire conduisant à la fois à des infections et à des maladies auto-immunes (Leonardi *et al.*,2022). Des déficiences héréditaires du complément ont été décrites pour tous les composants du complément et leurs régulateurs (Leonardi *et al.*,2022).

Bien qu'il s'agisse de maladies rares, les carences en complément sont souvent sévères, avec un début fréquent pendant l'enfance (Leonardi *et al.*,2022). Il joue un rôle clé dans l'élimination des pathogènes et dans l'homéostasie. Par ses propriétés, ce système a longtemps été considéré comme participant à la réponse anti-tumorale. Cependant, de récentes études ont permis de repositionner le complément en révélant ses effets pro-tumoraux, plus particulièrement des anaphylatoxines C3a et C5a, dans une grande variété de cancers (Daugan *et al.*,2017). Ces protéines agissent en effet à différents niveaux de la progression tumorale, que ce soit au sein des cellules tumorales, sur l'angiogenèse ou sur le microenvironnement immunitaire (Daugan *et al.*,2017).

II.2.1.- Inflammation et anaphylatoxie

Parmi les éléments intermédiaires de grande importance siégeant dans la cascade du complément, on retrouve les fragments C3a, C4a et C5a, aussi appelés anaphylatoxines, Ces produits de coupure du complément servent d'importants médiateurs de l'inflammation (Martel 2005). Elles sont également à l'origine d'une réponse inflammatoire induite par les anaphylatoxines C3a et C5a, Elles initient enfin l'assemblage du CAM ; le C5b qu'elles

gènèrent se lie aux protéines C6, C7, C8 et à plusieurs molécules de C9 qui s'ancrent à la membrane de la cellule permettant de former un pore lytique (Daugan *et al.*, 2017).

II.2.2.- Opsonisation et lyse cellulaire

La protéine C3b opsonise les agents pathogènes ou d'autres molécules cibles pour une destruction éventuelle et un clivage direct des agents pathogènes via des complexes d'attaque membranaire ou des complexes de clivage, résultant du clivage de C5 par la convertase C3 dans deux voies alternatives ou par la voie classique dans C5a et C5b (Frémeaux- Bacchia *et al.*, 2012). La liaison séquentielle de C5b à C6, C7, C8 et enfin C9 aboutit à l'assemblage d'un complexe C5b-9 hautement stable ou d'un complexe d'attaque membranaire (Guéguinou, 2012). L'agrégation de C9 induit l'insertion dans la membrane cellulaire et la formation de pores, conduisant à la lyse des cellules cibles (Diaz-Solano, 2017) .

II.3.- Voies d'activation

Une vingtaine de protéines participent à 4 voies d'activation dites « classique » , « alterne », « des lectines » et « finale commune ».

II.3.1.- Voie classique

L'activation de la voie classique repose sur la reconnaissance spécifique de la cible par un anticorps. Dans cette voie, c'est l'activation du composant C1 qui représente le phénomène initial. L'activation du C1 s'effectue principalement au niveau d'un complexe antigène-anticorps et la reconnaissance de la surface cible est effectuée par l'anticorps. Le C1 peut cependant être activé directement au contact de certaines surfaces bactériennes et virales et par l'intermédiaire de la C-reactive-protein (CRP), protéine de la phase aiguë de l'inflammation (Frémeaux- Bacchia *et al.*, 2012).

Après activation du C1 , les composants C4 et C2 sont activés et vont assembler sur la surface cible un complexe enzymatique, appelé C3/C5 convertase classique. L'activation du C4 présente de profondes analogies avec l'activation du C3. Le C4 est activé par clivage en C4b et C4a; le C4b, pendant une fraction de seconde après sa formation, expose un site réactionnel identique à celui du C3b lui permettant de se fixer, de façon covalente, avec le même type de groupements chimiques présents donc aussi bien sur les surfaces de l'hôte que sur la surface cible. Comme pour le C3b, il existe un système efficace de régulation contrôlant la fixation du C4b sur les surfaces de l'hôte (Leonardi *et al.*, 2022) .

II.3.2.- Voie alterne

L'activation de la voie alterne repose sur un mécanisme non spécifique de reconnaissance de la surface cible (bactérie, virus, parasite, cellule tumorale ...). Dans la voie dite « alterne », c'est la fixation d'un produit de clivage du C3, le C3b, qui représente le phénomène initial. Il existe un mécanisme permettant à l'organisme d'engendrer en permanence un petit nombre de molécules de C3b, rendant possible l'initiation immédiate de la voie alterne en présence d'une surface cible (Frémeaux- Bacchia et al., 2012). Le C3b, pendant une fraction de seconde suivant sa formation, à la remarquable propriété d'exposer un site hautement réactif lui permettant d'établir une liaison covalente avec des groupements chimiques présents sur virtuellement toutes les surfaces biologiques (sites accepteurs). Ainsi le C3b peut il se fixer sur une surface cible, si- celle-ci est présente, mais aussi sur les surfaces de l'hôte. En l'absence d'une surface acceptrice, le C3b réagi avec l'eau, donnant le C3b en phase fluide. Le C3b lié à une surface (mais aussi le C3b en phase fluide) peut fixer le facteur B et, après activation de ce dernier par le facteur D, se trouve assemblée la C3/C5 convertase alterne (Leonardi et al.,2022).

La reconnaissance de la cible est ainsi, dans la voie alterne, dévolue au C3b et cette reconnaissance est donc sans spécificité. Ce mécanisme non spécifique d'initiation explique le risque d'activation de la voie alterne dans la phase fluide et au niveau des surfaces de l'hôte, et la nécessité d'un contrôle efficace (Leonardi et al.,2022). Ce contrôle est exercé par un ensemble de protéines spécifiques. Ces protéines permettent à l'organisme de distinguer entre les surfaces dites« activatrices », sur lesquelles l'assemblage de la C3/C5 convertase alterne est possible, et les surfaces dites « non activatrices » comme les surfaces du soi, sur lesquelles cet assemblage est impossible (Daugan et al., 2017).

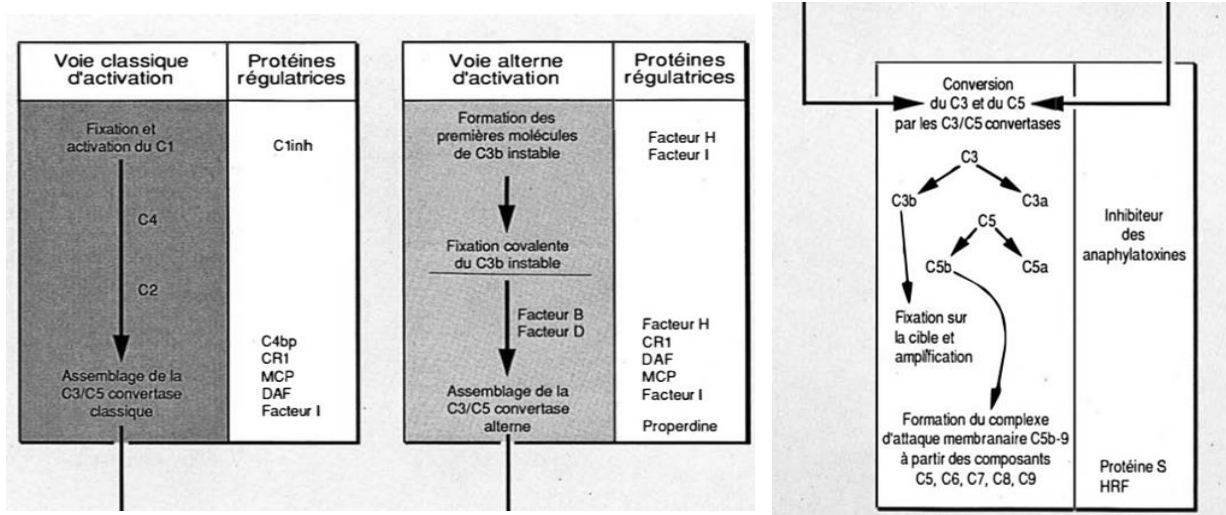


Figure 4 : Place des protéines de régulation dans les deux voies d'activation du système du complément (Leonardi et al.,2022).

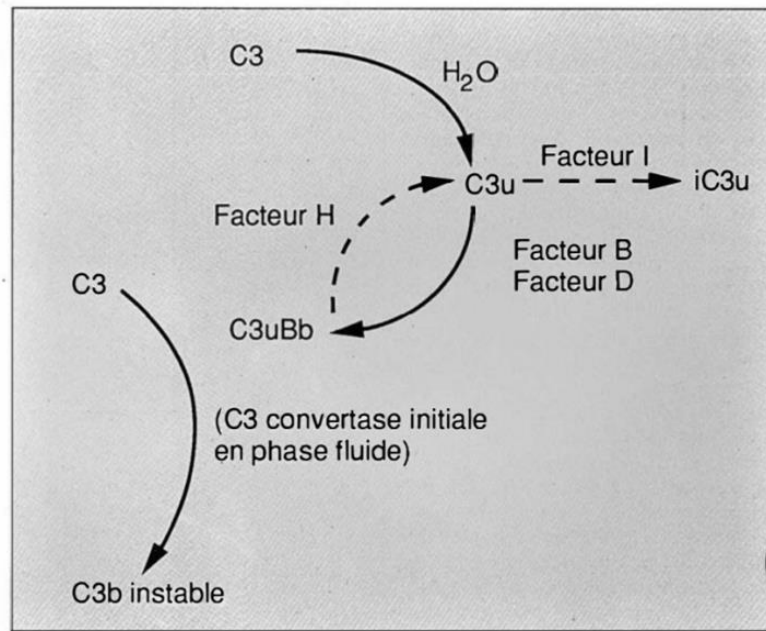


Figure 5: Boucle d'initiation du complément (Daugan et al., 2017).

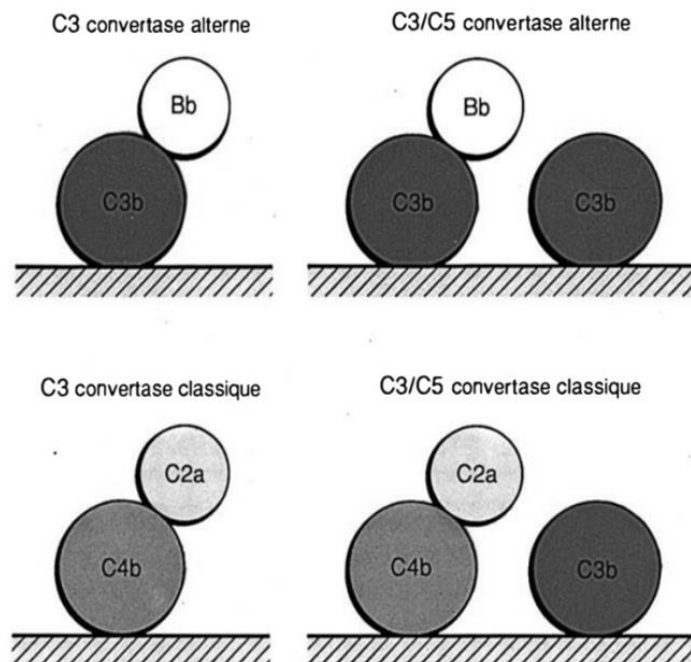


Figure 6: Composition moléculaire des C3/C5 convertases (Daugan et al., 2017).

II.3.3.- Voie des lectines (MBL)

La voie des lectines est quant à elle mise en place lorsque des microorganismes sont reconnus par des protéines « homologues » aux protéines du complexe C1 (C1q, C1r et C1s). En effet, la protéine MBL (Mannose-Binding Lectin) est capable de reconnaître les 6 protéoglycanes contenant du mannose à la surface des microorganismes, permettant ainsi l'auto-activation de 2 protéines associées à MBL et présentant une forte homologie avec C1r et C1s, respectivement MASP 1 et MASP 2 (MBL-Associated Serine Proteases). Une fois activée, MASP2 a la capacité de cliver le composant C4 en C4a et C4b (de la même manière que C1s dans la voie classique). Ensuite, C4b va pouvoir cliver C2 en C2a et C2b. La C3 convertase (C4b2a) est alors formée (Guéguinou, 2012).

II.3.4.- Voie finale commune

Lors de l'activation des voies du complément aboutissant à la formation des C3 convertases de la voie classique (C4b2a) ou de la voie alterne (C3bBb), une partie de ces molécules reste associée à C3b, suite au clivage de C3, pour former respectivement les complexes C4b2a3b (C5 convertase de la voie classique) et C3bBb3b (C5 convertase de la voie alterne). Ces 2 convertases de C5 ont pour fonction le clivage de C5 en C5a et C5b. Une molécule de C5b peut alors s'associer à une molécule de C6 (C5b6) qui s'associe à son tour à une molécule de C7 (C5b67), puis à une molécule de C8 (C5b678). Ce dernier complexe va alors pouvoir s'ancrer dans la membrane de la cellule-cible et recruter des molécules de C9 7 capables de polymériser (jusqu'à 18 molécules de C9) dans la membrane de la cellule-cible afin de former un pore. Ce complexe C5b5789(1-18) est appelé le complexe d'attaque membranaire (CAM), responsable de la lyse de la cellule-cible (Guéguinou, 2012).

II.4.- Déficiences en protéines du cascade hémolytique

Le système immunitaire inné dépend fortement du complément, et cela est maintenant bien compris. Cependant, si la cascade du complément n'est pas correctement activée ou contrôlée, elle peut entraîner une inflammation et des troubles auto-immuns (Zhang *et al.*, 1997). Parmi les pathologies causés par les déficiences en protéines du complément ; les pathologies auto-immunes, les pathologies rénales, les infections bactériennes et les Angio-œdèmes (Zhang *et al.*, 1997).

Tableau 1: Déficiences en complément et pathologies associées (Rosain *et al.*, 2014).

Composant déficient	Manifestation clinique
C1-inhibiteur	Angio-œdème bradykinique
C1q , C1r , C1s C4 , C4a, C4b	Lupus et maladies apparentées

	Infection bactériennes
	Glomérulonéphrite lupique
C2	Lupus et maladies apparentées
	Infection bactérienne asymptomatique
C3	Infection bactériennes
	Glomérulonéphrite
C5, C6, C7, C8, C9	Infections récurrentes <i>Neisseria</i>
Properdine	Infections fluminantes à <i>Neisseria</i>
Facteur B	Infection à pneumocoque et à <i>Neisseriameningitidis</i>
Facteur D	Infections bactériennes
Facteur H	Infections bactériennes
	Atteintes rénales (SHU atypique et glomérulopathies)
Facteur I	Infection bactériennes
CD46	Atteintes rénales et SHU atypique
CD59	Hémolyse chronique
	Polyneuropathies

II.5.- Traitements disponibles

II.5.1.- L'éculizumab

L'éculizumab est le premier inhibiteur du système du complément, est un bloqueur de clivage de C5 et ainsi la voie finale commune du complément C5b-C9. Il s'agit d'un anticorps monoclonal hybride IgG2/IgG4 kappa (Bauvois *et al.*, 2019). Il a été utilisé pour le traitement des maladies rares telles que hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) et le traitement du syndrome atypique hémolytique et urémique (SHUa) (Zuber *et al.*, 2012).

II.5.2.- Le ravulizumab

C'est un nouvel médicament thérapeutique classé comme un anticorps monoclonal anti-C5, Il est un inhibiteur de C5 qui se lie avec elle et inhibe son clivage en C5a et C5b donc le blocage de la formation de complexe finale C5b-9. il a une demi-vie plus longue que celle de l'éculizumab (Kulasekararaj *et al.*, 2019). Le ravulizumab est efficace chez les patients adultes atteints certains troubles hémolytique (Barbour *et al.*, 2021). C'est un anticorps hybride IgG2/IgG4 à longue durée d'action (145Kg)(Willirich *et al.*, 2021).

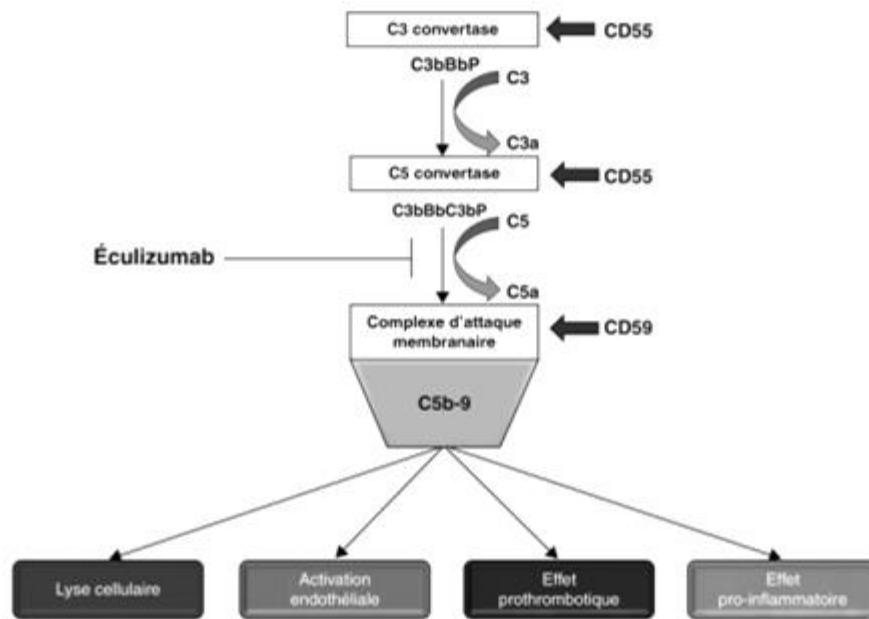


Figure 7 : Mécanisme d'action de l'eculizumab (Soliris®) (Chevallier, 2018).

III.- Bio-activités des polysaccharides

III.1.- Activité anti-inflammatoire

III.1.1.- Généralités sur l'inflammation

Lorsque le corps est en homéostasie, les cytokines ont des effets bénéfiques sur l'immunité innée et l'hématopoïèse, et elles sont essentielles au développement des organes (Murakami *et al.*, 2004). Parmi ses nombreux effets biologiques figurent l'induction de l'inflammation, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire, faisant du TNF- une cytokine bien connue (Aggarwal 2003). Le choc septique et la malignité ont tous deux un impact significatif sur sa fonction (Locksley *et al.*, 2001). Il a été démontré que les niveaux de TNF étaient élevés chez les patients atteints de septicémie ainsi que chez les sujets humains ayant reçu une endotoxine bactérienne (Gerard *et Rollins*, 2001). L'inflammation et les réactions pro-oxydatives sont essentielles au développement de nombreuses maladies, notamment l'arthrite, l'athérosclérose, la maladie de Crohn et diverses affections pulmonaires, comme en témoignent de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Gerard *et Rollins*, 2001).

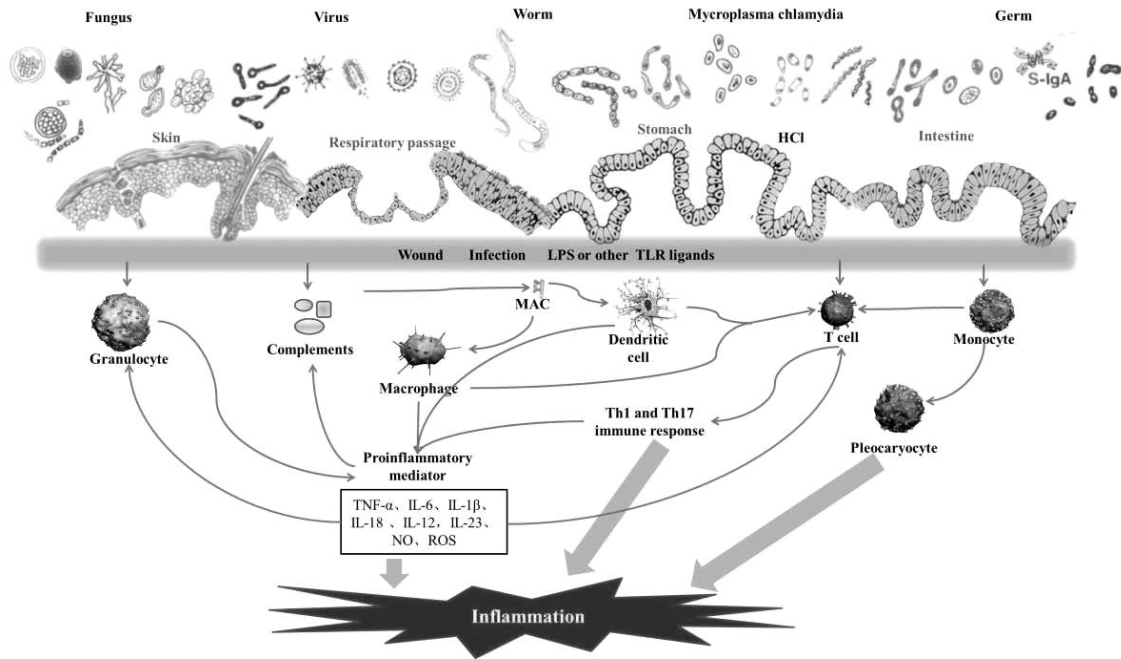


Figure 8: Une réponse immunitaire inflammatoire excessive (Jin *et al.*, 2020) .

III.1.2.- Mécanismes de l'activité anti inflammatoire

Les polysaccharides activent l'oxyde nitrique, le facteur de nécrose tumorale (TNF-), l'interleukine (IL)-1, l'IL-10 et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules immunitaires (macrophages, cellules de la plaque de Peyer et phagocytes) (Zhan *et al.*, 2018 ; Georgiev *et al.*, 2017). Néanmoins, lorsqu'ils sont exposés au lipopolysaccharide (LPS), ils réduisent la génération de médiateurs pro-inflammatoires et ont un effet anti-inflammatoire (Chen *et al.*, 2015 ; Xiong *et al.*, 2018).

Grâce à une interaction électrostatique avec le TLR2 extracellulaire, les polysaccharides préviennent les effets pro-inflammatoires de la voie du récepteur de type Toll 2-TLR1 en inhibant les voies de signalisation NF-B et p38/JNK MAPK et en favorisant la phosphorylation de MAPK. Les voies de signalisation TLR et myd88 sont impliquées dans la capacité de la chaîne latérale RG-I à inhiber l'expression de l'IL-12, de l'IL-1Ra, de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF-, du MCP-1 et du MIP-1 dans les cellules dendritiques (CD) ou des cellules épithéliales. La galectine-3 et Cs sont spécifiquement liées par les chaînes latérales RG-I. De plus, les polysaccharides réduisent la production d'IgE, mais pas d'IgG ou d'IgM. Selon (Wang *et al.*, 2016), il a été démontré que le RG-II réduit la production d'IL-4, bloque l'expression du gène de la protéine de liaison GATA 3 et de l'asthme, diminue la quantité d'éosinophiles et d'infiltration de cellules inflammatoires et augmente l'IFN.

Les médiateurs anti-inflammatoires (IL-1, IL-6, MCP-1 et MIP-2), la protéine inhibitrice des macrophages (MIP)-2, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) et la chimiokine dérivée des kératinocytes (KC) ont été régulé positivement par les polysaccharides en réponse au traitement. Il est possible que le corps encourage l'inflammation aux premiers stades de l'infection pour supprimer les antigènes, tout en supprimant l'inflammation dans les infections chroniques afin d'éviter les problèmes immunologiques (Fullerton et Gilroy, 2016).

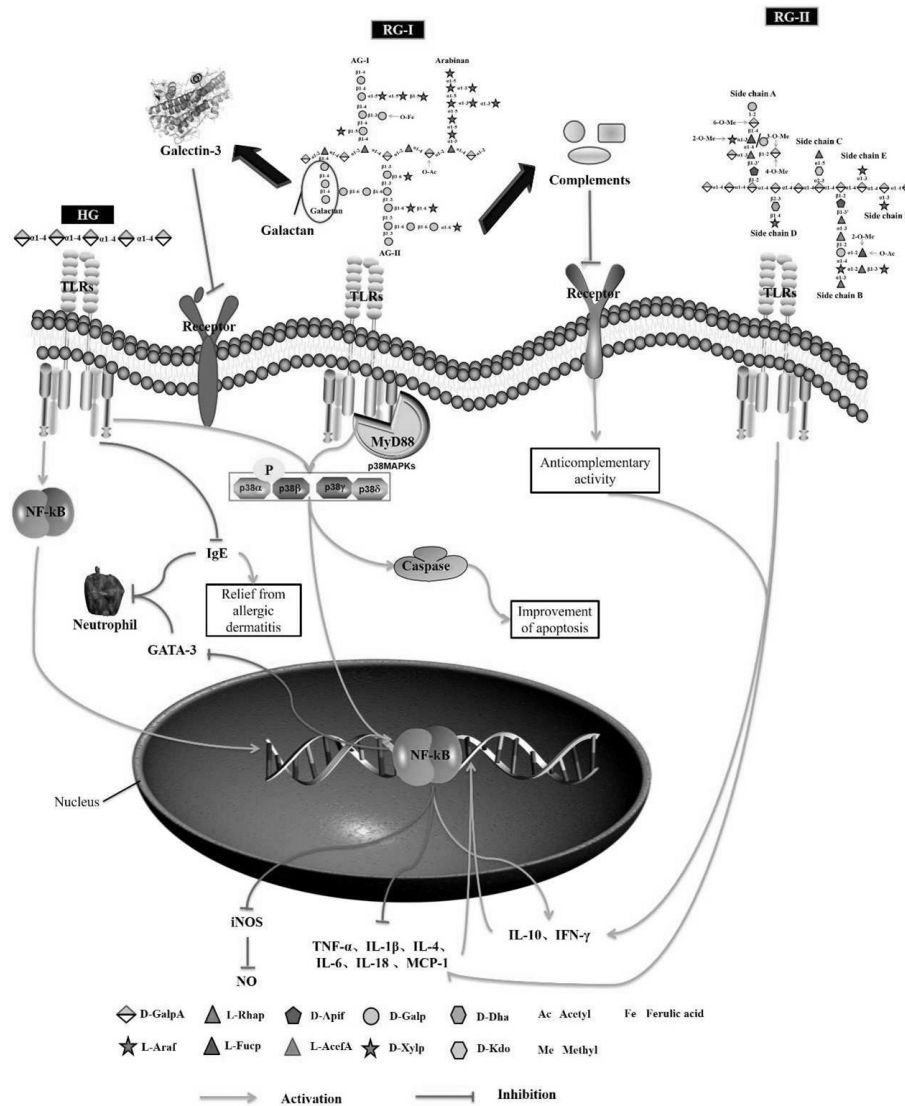


Figure 9: Régulation du système immunitaire par les polysaccharides (Jin et al., 2020).

L'inhibition de la pénétration de l'antigène peut être affectée par une fraction de polysaccharides qui sont principalement composés d'acide galacturonique, de galactose, de glucose et de xylose. Cela a réduit l'activité de la métalloprotéinase matricielle (MMP) et du

NF-B. (Wang *et al.*, 2016 ; Chatoui *et al.*, 2020). Les voies de signal AMPK, Nrf2 et NF-B jouent toutes un rôle dans la réduction de la synthèse d'IL-17, qui à son tour réduit le stress oxydatif et l'inflammation (Tan *et al.*, 2018). Les chercheurs ont découvert que l'inhibition de la production de NO induite par le LPS et l'expression d'iNOS et de COX-2 réduisaient l'inflammation (Wang *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2020 ; Jin *et al.*, 2020).

III.2.- Activité anti-complément

III.2.1.- Rôle du complément dans l'inflammation

Le complément est l'une des nombreuses enzymes plasmatiques qui jouent un rôle dans la réponse inflammatoire aux lésions tissulaires dans le corps (Gerard *et Rollins*, 2001). Les mastocytes et les monocytes et neutrophiles activés, qui sont extraits de la circulation sanguine, libèrent également des médiateurs inflammatoires. Les toxines C3a et C5a, qui sont des fragments de 77 et 74 acides aminés clivés de l'extrémité N-terminale des chaînes C3 et C5, sont libérées par le complément au cours de l'inflammation (Makrides *et al.*, 1998 ; Law *et al.*, 1995 ; Pugsley *et al.*, 2003).

III.2.1.- Mécanismes de l'activité anti-complément

Il a été démontré que les polysaccharides extraits des herbes atténuent la réponse inflammatoire causée par l'activation du système du complément, lorsque des polysaccharides se confrontent à une activation du complément dans les voies classiques, alternatives et lectine, Les anaphylatoxines C3a et C5a seront libérés (Lee *et al.*, 2020). *Bupleurum smithii* est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise utilisait les racines bupleuri dans les ordonnances de médicaments pour le traitement tels que les maladies inflammatoires, les maladies auto-immunes (Liu *et al.*, 2019).

L'extrait à l'eau chaude des racines de *Bupleurum smithii* a une activité anti-complément pour les deux voies classique et alterne, la molécule liée à cette propriété est un polysaccharide acide homogène et en plus ramifié qui est appelé D3-S1. Ce dernier contient 94,06% de glucides totaux, 27,20% d'acide uroniques et seulement 1,98% de protéine. La composition de monosaccharide de D3-S1 est examinée par l'analyse chromatographique en phase gazeuse. Le résultat a montré que ce polysaccharide est principalement composé d'arabinose, de galactose et d'acide galacturonique. Ainsi, il renferme des traces de rhamnose, de glucose, de xylose et de mannose. Il a un poids moléculaire moyen d'environ 2000000 DA (Xu *et al.*, 2007).

Des études préliminaires du mécanisme de l'inhibition du complément à l'aide de sérum qui est appauvri en composant de complément indiquent que D3-S1 réagit



sélectivement avec C1s, C3 et C4 mais pas avec C1q, C1r, C2, C5 et C9. Les résultats ont montré que le sérum appauvri de C1q et de sérum appauvri de C1r restaurant à l'activité hémolytique mais le sérum appauvri de C1s n'a pas d'effet hémolytique (Xu et al., 2007).

Lorsque le sérum appauvri en C2, C3 ou C4 est traité par D3-S1, les résultats indiquent que l'addition de sérum appauvri en C3 et en C4 n'affecte pas l'activité hémolytique du sérum traité par D3-S1, tandis que le sérum appauvri en C2 restaurant à l'activité hémolytique. Dans le cas des composants terminal du complément C5 et C9, l'activité hémolytique de sérum traité par D3-S1 est également restée (Xu et al., 2007).



Tableau 2 : Activité anti-complément des polysaccharides.

Espèces	Polysaccharides	Compositions	Propriété	Référence
<i>Lithospermum</i> <i>Euchromum</i>	LR- polysaccharide IIa	Les proportions en poids de la composition monosaccharidique est de Rhamnose 5%, Fucoze 6.1%, Arabinose 8.2%, Xylose 7.0%, Mannose 14%, Glucose 36%, Galactose 24%.	*Cabohydrates 81.2 % * Acides uroniques 15.0 % *Proteines 3.8 %	(Zhao et al., 1993).
<i>Dispsacus</i> <i>asperoides</i>	DAP-1	Constitués par trois fractions principales qui sont désignés comme DAP-2, DAP-3, DAP-4, ce dernier donne trois polysaccharides puissants ; DAP-4I-1a, DAP-4I-1b, et DAP-4IIa-1, ont consistaient en Glucose, Rhamnose, Arabinose, Mannose, dans un rapport molaire de 8,54 : 1,83 : 1,04 : 0,42 ; respectivement. L'analyse de méthylation a indiqué	*Un polysaccharide soluble dans l'eau (ADAPW). *Poids moléculaire de 16 kDa.	(Zhang. et al., 1997 ; Chen et al.,2013).



		que DAP-4I-1a comprenait principalement Gal lié en 4 et Glc lié en 3, 4 et 6, tandis que DAP-4Iia-1 consistait en Araf terminale, Glc lié en 3 et 3,6-Gal ramifié.	
<i>Angelica acutiloba</i>	AR-arabinogalactan (AR-I)	Constitué de Rhamnose 1.0%, Fucose 0.2%, Arabinose 7.4%, Xylose 0.3%, Mannose 4.6%, Glucose 2.6%, Galactose 8.3%.	*Hexoses 32.6% * Acides uroniques 38.5% (Yamada 1989). *Proteines 13.2%.
	Fractions		
<i>Cola corifolia</i>	70% CC1, 50% CC1P1, 20% CC1P2, 20% CC2 et 10% CC3.	Constitué d'Arabinose, 32% de Rhamnose, 35% d'acide galacturonique, 2% de galactose.	*Poids moléculaire: 135Da (Austarheim et al., 2012).

Chapitre II
Méthodologie

Le présent travail consiste à étudier l'activité anti-complément des polysaccharides hydrosolubles extraits d'une plante à caractère médicinal. Il s'agit de *Lepidium sativum* Linn (Brassicaceae). L'étude de l'activité anti-complément des polysaccharides *in vitro* a pour but de montrer leur pouvoir immuno-modulateur vis-à-vis la cascade hémolytique du complément, par la détermination de la capacité de bloquer l'activation de ce dernier via la voie alterne.

II.1.- Matériel d'étude

II.1.1.- Réactifs

Les propriétés des différents réactifs et les appareils utilisés au cours de l'expérimentation sont indiquées dans les tableaux N° 3 et 4.

II.1.1.1.- Tampons utilisés

(PBS); solution saline tamponnée au phosphate (Bouillot *et al.*, 1991). (ACP); tampon de la voie alterne qui contient le PBS/EGTA/Mg²⁺ (10/1/1 V/V) (Jeong *et al.*, 2004). 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° 5.

II.1.1.1.1.- Tampon de la voie alterne

Est du PBS contenant 100mM d'acide éthylène glycol-bis(β-aminoéthyl éther)N,N',N'-tétra acétique (EGTA) et 7 mM MgCl₂ ; La voie alterne ne nécessite pas des ions Ca²⁺ pour l'activation, mais elle nécessite des ions Mg²⁺ (Park *et al.*, 2004; Kerboua et Djenouhat, 2020). Ainsi, l'activation de la voie alternative se fait en présence de Mg²⁺/EGTA, qui chélate les ions de Ca²⁺, donc la voie classique est bloquée par ce réactif (Park *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 phosphate saline

La solution (PBS) est une solution isotonique composée de 8g Chlorure de sodium NaCl (137mM), 0,2g de Chlorure de potassium KCl(2,7mM), 0,2g de Dihydrogénophosphate de potassium anhydre KH₂PO₄(1,5mM), et 0,92g d'Hydrogénophosphatedisodique anhydre Na₂HPO₄ (8,1mM) (Billen *et al.*, 1991; Braun *et al.*, 2019).



Tableau 3 : Appareils utilisés au cours de l'expérimentation.

Produits	Fournisseur	Type	Fabrication
Agitateur magnétique	VELP CSIENTIFICA	F20520162	EUROPE
Bain marie	MEMMERT	MEMMERTGMBH. NENNTEMP;95 0C	GERMANY
Balance	OHAUS	DISCOVERY DV 215CD OHAUS	USA.
Centrifugeuse	SIGMA	SIGMA. 15PK, 14000 RPM	GERMANY
Autoclave	WEBECO	WEBECKE. P : 2.5BAR, T :138oC	/
Bec bunsen	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 4 : Caractéristiques des produits chimiques utilisés.

Produits	Fournisseur	Caractéristiques				
		Forme	Formule chimique	M.molaire g/mol	Densité g/cm ³	Pureté %
Chlorure de magnésium hydraté	BIOCHEM	Poudre	MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,30	2.32	98
Chlorure de potassium	CHEMOPHARMA 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
Ethanol	HONEYWELL	Liquide	C ₂ H ₅ OH	46.07	0.789	99
Acétone	SIGMA ALDRICH	Liquide	C ₃ H ₆ O	58.08	0.792	99
Acide tri-fluoro-acétique (TFA)	SIGMA ALDRICH	Liquide	CF ₃ COOH	114,02	1,49	99.8
Phosphate de potassium dibasique	BIOCHEM	Poudre	KH ₂ PO ₄	136.09	2.338	99
Hydrogénophosphate disodique anhydre	CHEMOPHARMA BIOCHEM	Poudre	Na ₂ HPO ₄	141,96	1.63	99.5
Chlorure d'hydrogène	CHEMOPHARMA SIGMA-ALDRICH	Liquide	HCl	36,458	1.19	37
Ethylène Glycol Bis (β-aminoethyl ether)- N,N,N',N'-tetra acetic acid)	SIGMA-ALDRICH	Poudre	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	380,35	1.4	97



Tableau 5 : Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation

Solution	Molarité	Méthode de préparation
EGTA	100Mm	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 pH7,4. 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	Cette solution est préparée en mélangeant 4,165 ml de l'HCl (12N) avec 45,835ml de l'eau distillée.
NaoH	0,1M	Pour la préparation de 100ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1M il est nécessaire de dissoudre 0,4g de NaoH dans un 100ml d'eau distillée.
MgCl ₂ 6H ₂ O	7Mm	Dissoudre 0,1423g de MgCl ₂ 6H ₂ O 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 graines de la plante *Lepidium sativum* Linn(Brassicaceae), les érythrocytes et le sérum humain normal (SHN).

II.1.2.1.- Extraction des polysaccharides hydrosolubles

15 grammes de graine de *Lepidium sativum* L 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.- Obtention des oligosaccharides

Les fractions des oligosaccharides sont obtenues à partir des polysaccharides hydrosolubles isolés des graines de *Lepidium sativum*L. L'hydrolyse acide partielle des liaisons glycosidiques est effectuée par l'acide trifluoroacétique. Une quantité de 10mg de polysaccharide de *Lepidium sativum* L, est hydrolysée dans un tube en verre à bouchon vissant à l'aide de 1ml de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0.05M pendant 45minutes à 80°C (Boual, Z. et al., 2015; Michaud et al., 2011; Kruse et al., 2020; Zhang et al., 2021). 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. Les hydrolysats sont récupérés dans 1ml de l'eau ultra pure (Deng et al., 2018; Miller et al., 2020).

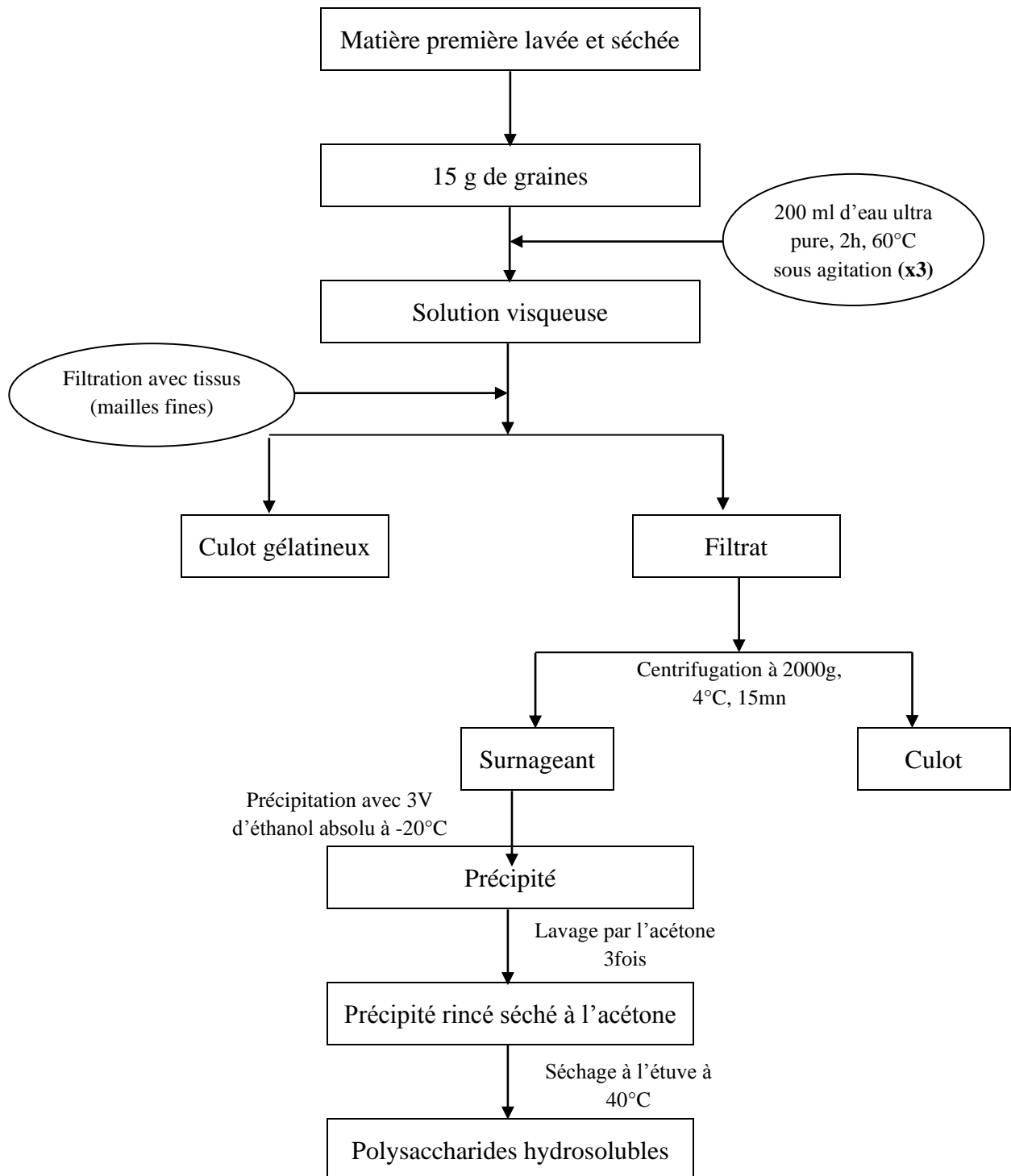


Figure 10: Schéma de différentes étapes de l'extraction des polysaccharides hydrosolubles (Benaoun et al., 2017; Chouana et al., 2017).

II.1.2.3.- Prélèvement du sang

Le sang (2 ml) est prélevé à partir de volontaire sain, de sexe masculin, âgé de 20 à 50ans le jour même de son utilisation au niveau de laboratoire IBN ROCHD Ghardaïa. L'absence d'antigène HBs (Virus de l'hépatite B), d'anticorps anti-VIH (Virus de l'immunodéficience humaine) et d'anticorps anti-VHC (Virus de l'hépatite C) est vérifiée (Cha *et al.*, 1998). Ainsi, le groupage des patients est confirmé (Amato *et al.*, 2011 ; Cha *et al.*, 1998).

II.2.- Méthodes d'étude du test anti-complément AP100

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 humain causée par le sérum humain normal ; SHN (Benmadi *et Aied*, 2018). Le dosage d'AP100 apprécie l'activité fonctionnelle globale de la voie alterne sur des boîtes d'agarose- érythrocytes humain, 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, les dosages hémolytiques y' compris l'AP100 permettent de mesurer l'activité fonctionnelle des protéines du complément, 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 (Michel-Souzy, 2017). 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, les tests d'hémolyses utilisant la technologie AP100 permettent d'évaluer la capacité de certaines substances biologiquement actives d'origine naturelle, comme les oligosaccharides, à moduler la voie alterne du système du complément.

II.2.1.- Préparation des hématies et sérum

Les hématies et le sérum sont obtenues selon la méthode décrite par (Bouillot *et al.*, 1991 ; Zhang *et al.*, 2019).

1. Prélever 2ml du sang des volontaires sains âgés de 20-50 ans ;
2. Verser le sang dans un tube à centrifugation contenant l'anticoagulant (héparine) ;
3. Séparer le sérum du culot cellulaire ;
4. Laver le culot cellulaire avec le tampon ACP trois fois ;
5. Ajouter 5,4 ml d'ACP au 0,6 ml de globules rouges pour obtenir une suspension de globules rouges de 10% ;

Le sérum est dilué à 1:6 dans le tampon ACP après centrifugation du sang est prélevé dans un tub sec.

II.2.2.- Préparation de solution mère et dilution des oligosaccharides et de l'héparine

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° 6.

II.2.3.- Préparation des boites du test

1. Mélanger le gel, avec 2ml de la suspension de globules rouge 10% préparée précédemment à 45°C ;
2. Verser le mélange dans les boites Pétri et éliminez les bulles ;
3. Refroidir les boites 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 boites à 4°C au réfrigérateur.

Tableau 6: Méthode de dilution des oligosaccharides de *Lepidium sativum* L (Brassicaceae)

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 7 : Position systématique et usages thérapeutiques de la plante *Lepidium sativum* L (Brassicaceae)

Famille	Nom scientifique	Nom Arabe	Vivace/ Éphémère	Répartition	Partieu tilisée	Mode d'utilisation	Indications traditionnelles
Brassicaceae	<i>Lepidium sativum</i> Linn	Heb el-rchad حب الرشاد	Éphémère	Les régions tropicales	Graines	Poudre	Cicatrisation, anti inflammatoire, traitement des maux d'estomac, l'anémie

Tableau 8 : La classification de *Lepidium Sativium* L (Raval 2016).

Règne	Plantae	Plantes
Sous-règne	Tracheobionta	Plantes vasculaires
Superdivision	Spermatophyta	Spermatophytes
Division	Magnoliophyta	Angiosperme
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledones
Sous Classe	Dilleniidae	
Ordre	Capparales	
Famille	Brassicaceae	Famille de moutarde
Genre	Lepidium	Herbes poivrées
Espèce	<i>Lepidium Sativum</i> Linn	Cresson de jardin

II.2.4.- Test anti-complément AP100

II.2.4.1.- Pré-incubation

Après la dilution des oligosaccharides de *Lepidium sativum* L 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 (Curtis *et al.*, 2001 ; Allen *et al.*, 2016; Dickson *et al.*, 2018).

II.2.4.2.- Incubation

L'incubation des mélanges réactionnels du test anti complément ; oligosaccharides, héparine et SHN est effectuée dans des boites Pétri d'AP100 déjà préparées. 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(George *et al.*, 2013 ; Hong *et al.*, 2013). Les puits dans chaque boite d'AP100 contiennent ;



1. Echantillon : 25 μ l de chaque dilution de solution des oligosaccharides de *Lepidium sativum*; 200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 600 μ g/ml, 800 μ g/ml, 1000 μ g/ml;
2. Contrôle positif : 25 μ l de l'héparine ; 1000 μ g/ml ;
3. Contrôle négatif : 25 μ l du SHN diluée à 1:6.

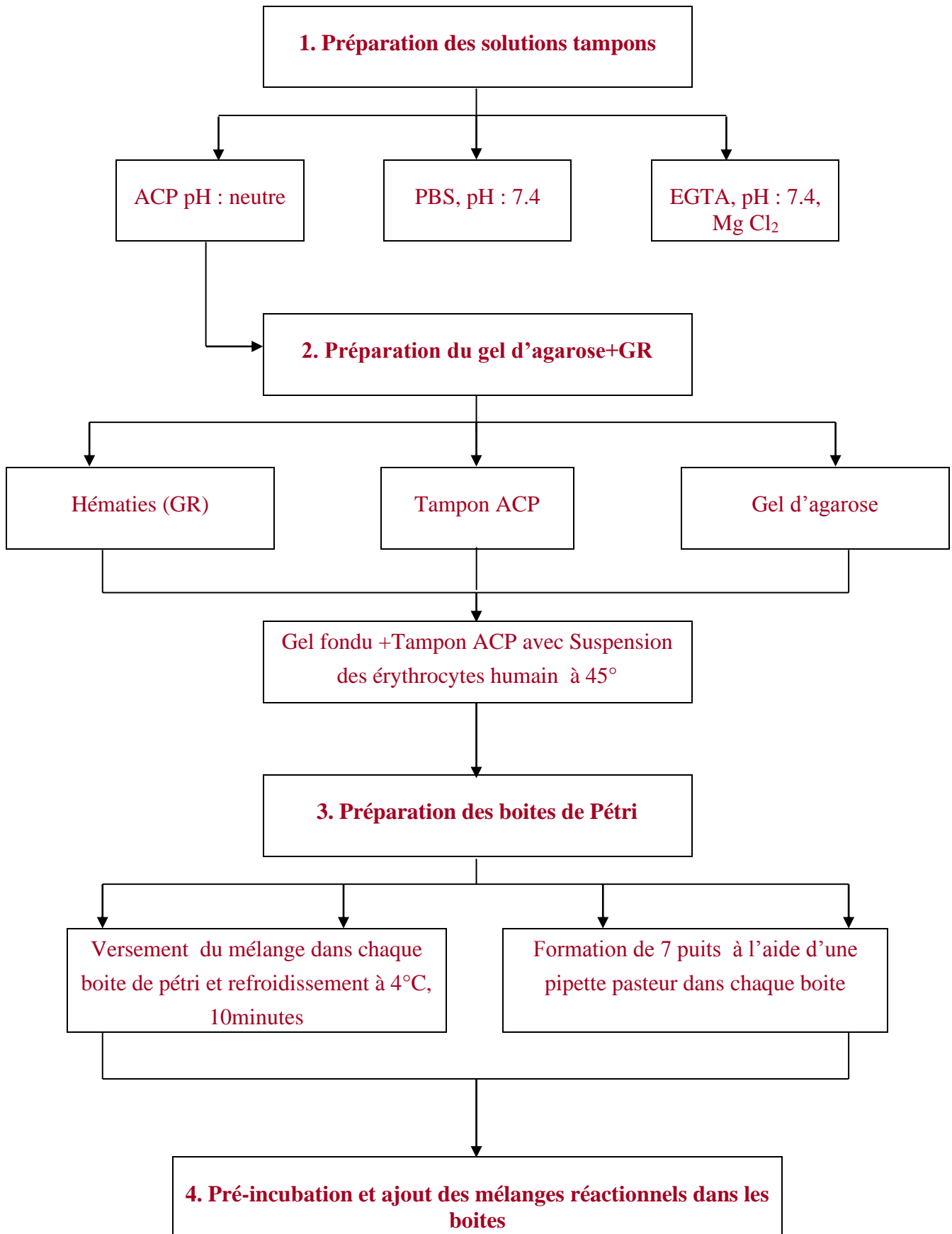


Figure 11: Schéma de différentes étapes de préparation des boîtes AP100



Tableau 9 : Test anti-complément AP100 (7puits pour chaque boîte Pétri)

Concentrations des oligosaccharides ($\mu\text{g/ml}$)		0	200	400	600	800	1000
Contrôle positif	Sérum ; 1:6(μl)	/	/	/	/	/	25
	Héparine (μl)	/	/	/	/	/	25
<i>Lepidium sativum</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.- Calcul

Les zones de lyse obtenues après l'incubation sont mesurées pour effectuer les mesures de surface de lyse, pourcentage de lyse et taux d'inhibitions.

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.

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

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

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

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.1.- Rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles

Les caractéristiques de l'extrait des polysaccharides hydrosoluble issu des graines de *Lepidium sativum L* sont représentées dans le tableau N° 9.

Tableau10: Propriétés de l'extrait des graines de *Lepidium sativum L*.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement
Polysaccharide hydro soluble	Poudre (visqueuse en solution aqueux)	Blanc	3,86 %

Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage %, Celui de cette étude est obtenu des graine de *Lepidium sativum L* (Brassicaceae). Un rendement constant est une exigence essentielle pour une bonne fidélité et exactitude du résultat analytique, il dépend des caractéristiques de chaque substance et des conditions de travail. Le rendement d'extraction acquis des graines de *Lepidium sativum L* est de **3,86 %**.

Une autre étude de Razmkhah et al., 2016 ont effectué aussi une extraction des polysaccharides hydrosolubles des graines de *Lepidium sativum L* et ont trouvé un rendement d'extraction de **4,187 %**. Ce rendement semble proche de celui de notre étude. Le rendement d'extraction Des polysaccharides est influencé par la température d'extraction, le pourcentage eau/matière première, dépend des caractéristiques des graines de lepidium sativum L et aussi par le temps d'extraction .

III.2.- Activité anti-complément des oligosaccharides ; Test AP100

AP100 est le dosage hémolytique qui exprime le fonctionnement de la voie alterne du complément. Il est basé sur les observations de la lyse des érythrocytes par la cascade hémolytique du complément. A travers ce test on vise la dilution de sérum capable de provoquer 100% de l'hémolyse et la concentration des oligosaccharides capable de bloquer le complément à 100%. 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 de *Lepidium sativum L* et l'héparine sont représentés dans les figures N° 12 et 13.

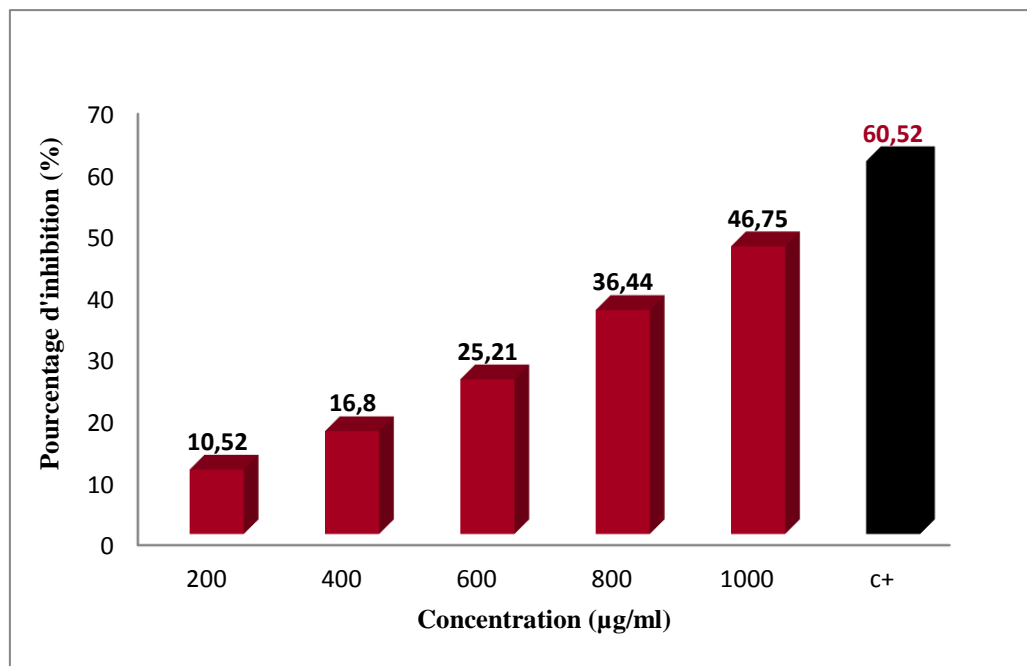


Figure 12: Pourcentages de l'inhibition de l'hémolyse par la cascade hémolytique du complément en présence des oligosaccharides et l'héparine ; contrôle positif.

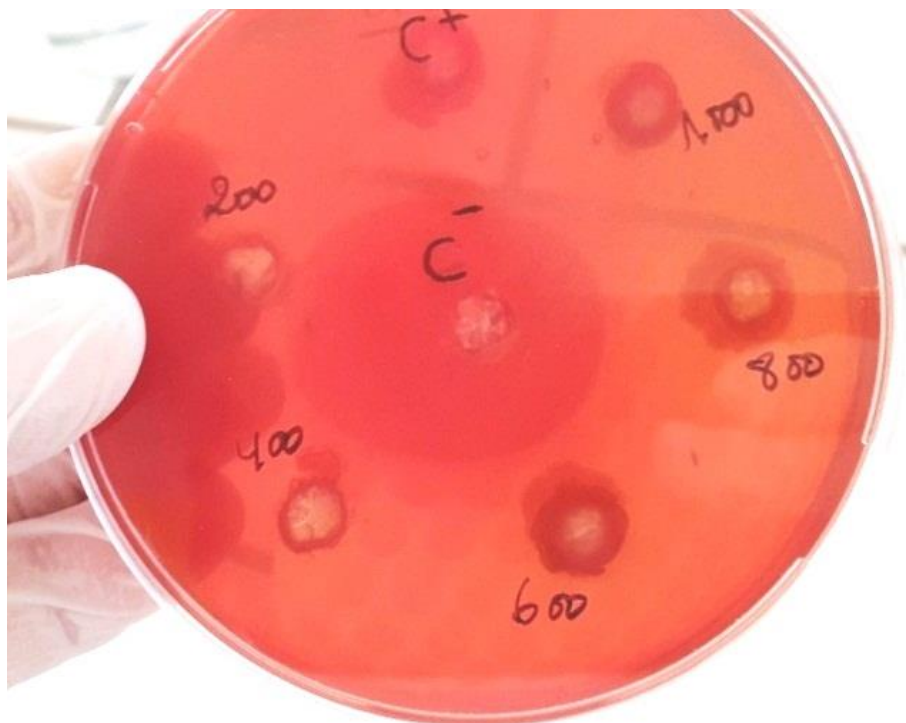


Figure 13 : Test hémolytique (anti-complément) AP100 des Oligosaccharides de *Lepidium sativum* L.

La technique hémolytique fonctionnelle AP100 utilisée dans cette étude de l'activité anti-complément des oligosaccharides de *Lepidium sativum* L pour déterminer le pouvoir de l'inhibition de la voie alterne nous a accordé les résultats suivants ;

Les oligosaccharides extraits de *Lepidium sativum* L issus de l'hydrolyse de ses polysaccharides hydrosolubles présentent une activité anti-complément. Où l'effet des oligosaccharides de *Lepidium sativum* L sur l'activation de la voie alterne de système du complément humain a été examiné dans le SHN dilué à 1:6 et l'héparine a été utilisée comme référence. Ces derniers ont un effet sur l'activation de système du complément humain par la voie alterne en inhibant la lyse des hématies qui est le résultat de l'inhibition de la cascade hémolytique de ce système.

L'inhibition de l'hémolyse des hématies par les oligosaccharides était de manière dose-dépendante avec les pourcentages 10,52%, 16,8%, 25,21%, 36,44% et 46,75% correspondant respectivement aux concentrations 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml, 1000µg/ml. Le contrôle positif représenté par le polysaccharide sulfaté; l'héparine a bloqué aussi l'hémolyse et a présenté une inhibition de 60,52% avec la concentration de 1000µg/ml.

L'héparine altère la fraction C3 du complément de nature lipoprotéinique par l'activation d'une lipoprotéine lipase (Conte *et al.*, 1970).

L'acide galacturonique affecte positivement le pouvoir d'inhibition des polysaccharides au contraire de l'acide glucuronique (Laurent, *et al.*, 2011). La masse molaire possède un effet considérable sur l'activité anti-complément (Xu *et al.*, 2000). Les teneurs relativement accentuées en acide galacturonique sont aussi très importantes pour l'inhibition de la cascade 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 (Laurent *et al.*, 2011).

D'autre part les teneurs élevées en arabinose et en galactose avec l'existence de ramifications sont des exigences pour l'activité anti-complément (Samuelsen *et al.*, 1998; Sang *et al.*, 2007). Une fraction à haut poids moléculaire de l'extrait brut des polysaccharides, obtenu à partir des racines de *Bupleurum chinense*, a montré une concentration de 650 µg/ml un fort effet inhibiteur sur l'hémolyse. Ses polysaccharides sont constitués principalement de mannose (Di *et al.*, 2012).

Les polysaccharides hydrosolubles extraits des graines de *Lepidium sativum* L (Brassicaceae) sont constitués de mannose 38,9%, glucose 1%, de galactose 4,7% , acide glucuronique 6.7%, acide galacturonique 8.0%, fructose 6.8%, arabinose 19.4%, et rhamnose



1.9% (Al Mahdaoui et Al-Aubadi, 2020). L'activité anti-complément des oligosaccharides extrait à partir des graines de *Lepidium Sativum L* est probablement due à la richesse en mannose et en plus la présence d'arabinose, galactose qui sont des facteurs inhibiteurs des protéines du complément. La faible quantité de l'acide glucuronique qui réduit le taux d'inhibition justifie aussi le pouvoir inhibiteur de ce hétéro polysaccharide (Laurent, et al., 2011).

Les charges électro-négatives des hématies humaines provoquée par la présence de l'acide sialique ont un effet considérable (Micouni et al., 1983 ; Bouchatal, 2015). Parce que l'activation de la voie alterne dépendent notamment de la proportion de l'acide sialique (Kazatchkine, 1982).

Le facteur I permet un lien entre la cible responsable de l'activation et les cellules de l'immunité par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique CR3 exprimé par des cellules impliquées dans l'adhésion cellulaire et dans la phagocytose. En cas de déficit en facteur I, le C3 qui n'est plus inactivé participe à la formation de la C3 convertase alterne, qui clive en permanence le C3 et entraîne une diminution des taux plasmatiques de C3 et à moindre degré du facteur B. Cette déplétion secondaire en C3 peut être aussi causée par un déficit congénital en facteur H, cofacteur du facteur I (Monfort-Gouraud et al., 2006).

La protéine H, responsable de l'inhibition et la dégradation de la C3 convertase (C3bBb) ; une enzyme qui clive le C3 (Fraisson et al., 2011) est la principale protéine de régulation de la voie alterne du complément (Blanc et al., 2014). Les caractéristiques biochimiques de la surface sont responsables de cette modification de l'affinité du facteur H pour le C3b (Ripoche et al., 1989). Une forte teneur en acide sialique ou en héparine renforcent l'affinité du facteur H pour le C3b et confèrent un caractère non activateur à la surface considérée (Fischer et al., 1993).

La formation du complexe C3b-H est important pour le fonctionnement de la voie alterne du système du complément parce qu'elle autorise d'inhiber la formation du complexe d'attaque membranaire à la surface de nos cellules qui va par la suite protéger l'organisme de toute destruction auto-immune. L'interaction du facteur H avec le C3b permet notamment de favoriser l'inactivation protéolytique de C3b par le facteur I, bloquant de ce fait l'activation de la voie alterne (Ripoche et al., 1989 ; Fraisson et al., 2011).

Conclusion

Conclusion

Le système du complément a un fonction important dans les réponses immunitaires par l'élimination des pathogènes, grâce à son activation en cascade selon 3 voies ; la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Une déficience de certains composants de ce système peut provoquer des pathologies associées tels que des infections et des maladies auto-immunes.

La richesse des graines de la plante de *Lepidium sativum L* en mucilage nous à permis d'obtenir par extraction des nouvelles sources des polysaccharides hydrosolubles pour l'étude de l'activité anti-complément où à partir de cela on vise à valoriser les plantes médicinale qui sont disponible en Algérie et qui contiennent des molécules bioactif ont des différentes activités (Anti-complément , anti-inflammatoire, antioxydant ..).

Les résultats de cette étude de l'activité anti-complément des oligosaccharides de *Lepidium sativum L* (Brassicaceae) sont intéressants, ces derniers ont montré une efficacité d'inhiber la cascade hémolytique de la voie alterne du complément après l'utilisation de la technique hémolytiques AP100. Les oligosaccharides de *Lepidium sativum L* ont donné un taux d'inhibition modéré de l'ordre de 46,75% à une concentration de 1000µg/ml, et l'héparine à inhibé 60,52%, de l'hémolyse. On peut dire que les polysaccharides hydrosolubles de *Lepidium sativum L* présentent une activité anti-complément intéressante.

A travers cette étude, nous avons réussi à confirmer partiellement que les oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des polysaccharides de *Lepidium sativum L* (Brassicaceae) peuvent bloquer la voie alterne du complément d'une manière dose-dépendante. Avec cela, des études complémentaires sont nécessaires pour bien comprendre la relation structure fonction entre l'extrait et ses activités étudiées. Ces études doivent être également orientées vers la détermination précise de la mécanisme d'effet des composant de l'extrait de *Lepidium sativum L* dans le processus d'inhibition de système du complément.

Références
bibliographiques

- 1- **Adam, S. E. I.** (1999). Effects of various levels of dietary *Lepidium sativum* L. seeds in rats. *The American journal of chinese medicine*, 27(03n04), 397-405.
- 2- **Aggarwal, B. B.** (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews immunology*, 3(9), 745-756.
- 3- **Al Mahdawi, A. U. R., & Al-Aubadi, I. M.** DETECTION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF GUM (*LEPIDIUM SATIVUM* L.) SEEDS.
- 4- **Allen, M., Burgess, J. D., Ballard, T., Wang, X., Younkin, C. S., Sun, Z., ... & Ertekin-Taner, N.** (2016). Gene expression, methylation and neuropathology correlations at progressive supranuclear palsy risk loci. *Acta neuropathologica*, 132(2), 197-211.
- 5- **Amato, Ostro, B., Tobias, A., Querol, X., Alastuey, A., F., Pey, J., ... & Sunyer, J.** (2011). The effects of particulate matter sources on daily mortality: a case-crossover study of Barcelona, Spain. *Environmental health perspectives*, 119(12), 1781-1787.
- 6- **Aouadhi, S.** (2022). Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Mém. Mas. en toxicologie. Faculté de médecine de Tunisie.
- 7- **Aqafarini, A., Lotfi, M., Norouzi, M., & Karimzadeh, G.** (2019). Induction of tetraploidy in garden cress: morphological and cytological changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(3), 627-635
- 8- **Austarheim, I., mahamane, H, sanogo ,R, et al.** Polysaccharides anti-ulcéreux issus de l'écorce et des feuilles de *Cola cordifolia*. *Journal d'ethnopharmacologie* , 2012.
- 9- **Barbour, T., Scully, M., Ariceta, G., Cataland, S., Garlo, K., Heyne, N., ... & Wong, E. K.** (2021). Long-term efficacy and safety of the long-acting complement C5 inhibitor ravulizumab for the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome in adults. *Kidney international reports*, 6(6), 1603-1613.
- 10- **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.
- 11- **Benaoun, F., Delattre, C., Boual, Z., Ursu, A. V., Vial, C., Gardarin, C., ... & Pierre, G.** (2017). Structural characterization and rheological behavior of a heteroxylan extracted from *Plantago notata* Lagasca (*Plantaginaceae*) seeds. *Carbohydrate polymers*, 175, 96-104.
- 12- **Benmadi, S., et Aied W.,** (2018). OUARGLA,U. Etude de l'effet du lait et des urines camelins sur la voie alterne du complément dans le cancer de sein. 2018.
- 13- **Bhat, N. A., Wani, I. A., & Hamdani, A. M.** (2020). Tomato powder and crude lycopene as a source of natural antioxidants in whole wheat flour cookies. *Heliyon*, 6(1), e03042.
- 14- **Bhupal, N.,** Neutrophil Adhesion Test as tool for Immunomodulatory Activity Of Different Extracts of *Lepidium Sativum* Linn. Seeds. 2020.

- 15- **Billen , Servais, P, G.**, Ventresque, C., & Bablon, G. P. (1991). Microbial activity in GAC filters at the Choisy-le-Roi treatment plant. *Journal-American Water Works Association*, 83(2), 62-68.
- 16- **Blanc, C.**, Chauvet, S., Le Quintrec, M., Togarsimalemath, S. K., Roumenina, L., Lapeyraque, A. L., ... & Dragon-Durey, M. A. (2014). Auto-anticorps anti-facteur H dans les glomérulopathies à C3. *Néphrologie & Thérapeutique*, 10(5), 344.
- 17- **Boual, Z.**, Chouana, T., Kemassi, A., Hamid Oudjana, A., Daddi Bouhoun, M., Michaud, P., & Ould El Hadj, M. D. (2015). Étude physicochimique et biologique des polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae). *Phytothérapie*, 13(6), 396-402.
- 18- **Bouchatal, A.** (2015). Importance des glycoconjugués périphériques dans la différenciation myogénique : Rôle particulier de l' Ω (2, 6) sialylation (Thèse de doctorat, Limoges).
- 19- **Bouillot, Toulon, P.**, Chadeuf, G., J. L., Amiral, J., CAMBILLAUH, M., Sultan, Y., & Aiach, M. (1991). Involvement of heparin cofactor II in chymotrypsin neutralization and in the pancreatic proteinase—antiproteinase interaction during acute pancreatitis in man. *European journal of clinical investigation*, 21(3), 303-309.
- 20- **Braun, Torban, E., F.**, Wanner, N., Takano, T., Goodyer, P. R., Lennon, R., ... & Huber, T. B. (2019). From podocyte biology to novel cures for glomerular disease. *Kidney international*, 96(4), 850-861.
- 21- **Cha, C., Gao, P.**, Chen, Y. C., Shaw, P. D., & Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), 1119-1129.
- 22- **Chatoui, K.**, Harhar, H., El Kamli, T., & Tabyaoui, M. (2020). Chemical composition and antioxidant capacity of *Lepidium sativum* seeds from four regions of Morocco. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- 23- **Chen, J.**, Yao, D., Yuan, H., Zhang, S., Tian, J., Guo, W., ... & Zhang, Y. (2013). *Dipsacus asperoides* polysaccharide induces apoptosis in osteosarcoma cells by modulating the PI3K/Akt pathway. *Carbohydrate polymers*, 95(2), 780-784.
- 24- **Chen, L.**, Liu, J., Zhang, Y., Dai, B., An, Y., & Yu, L. (2015). Structural, thermal, and anti-inflammatory properties of a novel pectic polysaccharide from alfalfa (*Medicago sativa* L.) stem. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(12), 3219-3228.
- 25- **Chevallier, Vallet, N.**, de Fontbrune, FS, Loschi, M., Desmier, D., Villate, A., Barraco, F., ... & de Latour, RP (2018). Greffe de cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne préalablement traités par eculizumab : une étude rétrospective de 21 patients des centres SFGM-TC. *Haematologica* , 103 (3), e103.
- 26- **Chouana, T.**, Pierre, G., Vial, C., Gardarin, C., Wadouachi, A., Cailleu, D., ... & Delattre, C. (2017). Structural characterization and rheological properties of a galactomannan from *Astragalus gombo* Bunge seeds harvested in Algerian Sahara. *Carbohydrate polymers*, 175, 387-394.

- 27- **Conte, J.**, That, H. T., Mignon-Conte, M., & Sue, J. M. (1970). Traitement des glomerulonephrites aiguis severes par l'heparine et les epurations extra-renales repetees. *Proc Eur Dial Transpl Assn*, 7, 273-285.
- 28- **Curtis, M. A.**, Aduse-Opoku, J., & Rangarajan, M. (2001). Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 12(3), 192-216.
- 29- **Daugan, M.**, Noe, R., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., & Roumenina, L. T. (2017). Le système du complément- Une épée à double tranchant dans la progression tumorale. *médecine/sciences*, 33(10), 871-877.
- 30- **Deng, Lin, L. M.**, Zhao, L. J., J., Xiong, S. H., Tang, J., Li, Y. M., ... & Liao, D. F. (2018). Enzymatic extraction, purification, and characterization of polysaccharides from *Penthorum chinense* Pursh: natural antioxidant and anti-inflammatory. *BioMed Research International*, 2018.
- 31- **Di, H.**, Zhang, Y., & Chen, D. (2013). An anti-complementary polysaccharide from the roots of *Bupleurum chinense*. *International journal of biological macromolecules*, 58, 179-185.
- 32- **Diaz-Solano, D.**, Fuenmayor, J. et Montaña, RF (2018). Opsonisation améliorée des globules rouges humains Rhésus D-positifs par des anticorps anti-G polymères recombinants d'immunoglobuline G. *Transfusion sanguine*.
- 33- **Dickson, Cutress, R. I.**, McIntosh, S. A., Potter, S., Goyal, A., Kirwan, C. C., Harvey, J., ... & Winters, Z. E. (2018). Opportunities and priorities for breast surgical research. *The Lancet Oncology*, 19(10), e521-e533.
- 34- **El-Hagggar, M.**, El-Hosseiny, L., Ghazy, N. M., El-Fiky, F. K., & El-Hawiet, A. (2021). Phytochemical investigation, antimicrobial and cytotoxic activities of suspension cultures of *Lepidium sativum* L. *South African Journal of Botany*, 138, 500-505.
- 35- **Fahami, A.**, & Fathi, M. (2018). Development of cress seed mucilage/PVA nanofibers as a novel carrier for vitamin A delivery. *Food Hydrocolloids*, 81, 31-38.
- 36- **Fischer, E.**, & Kazatchkine, M. (1993). Rôle du complément dans la réaction inflammatoire. *Veterinary Research*, 24(4), 346-348.
- 37- **Fraison, J. B.**, Pernin, V., Alméras, C., Vetromile, F., Frémeaux-Bacchi, V., & Mourad, G. (2011). Microangiopathie thrombotique de novo post-transplantation rénale révélant un déficit en facteur H et en facteur I. *La Revue de médecine interne*, 32(6), e81-e83.
- 38- **Frémeaux-Bacchi, V.**, Ngo, S., Bordereau, P., Poulain, N., Roncelin, S., Blouin, J., ... & Dragon-Durey, M. A. (2012). Exploration du complément: actualités 2012. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2012(444), 31-37.
- 39- **Fullerton, J. N.**, & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews Drug discovery*, 15(8), 551-567.
- 40- **George, Heraty, J. M.**, Burks, R. A., Cruaud, A., Gibson, G. A., Liljebblad, J., Munro, J., ... & Yoder, M. (2013). A phylogenetic analysis of the megadiverse C halcidoidea (Hymenoptera). *Cladistics*, 29(5), 466-542.

- 41- **Georgiev, Y. N.**, Paulsen, B. S., Kiyohara, H., Ciz, M., Ognyanov, M. H., Vasicek, O., ... & Kratchanova, M. G. (2017). Tilia tomentosa pectins exhibit dual mode of action on phagocytes as β -glucuronic acid monomers are abundant in their rhamnogalacturonans I. Carbohydrate polymers, 175, 178-191.
- 42- **Gerard, C.**, & Rollins, B. J. (2001). Chemokines and disease. Nature immunology, 2(2), 108-115.
- 43- **Guéguinou, N.** (2012). Modifications de l'immunité humorale induites par des changements de la gravité (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- 44- **Hong, Mathur, A.**, Loskill, P., S., Lee, J. Y., Marcus, S. G., Dumont, L., ... & Healy, K. E. (2013). Human induced pluripotent stem cell-based microphysiological tissue models of myocardium and liver for drug development. Stem cell research & therapy, 4(1), 1-5.
- 45- **Itou, R. D. G. E.**, Sanogo, R., Ossibi, A. W. E., Ntandou, F. G. N., Ondelé, R., Pénemé, B. M., ... & Abena, A. A. (2014). Anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract of stem bark of Ceiba pentandra Gaertn. Pharmacology & Pharmacy, 5(12), 1113.
- 46- **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.
- 47- **Jin, W.**, Fang, Q., Jiang, D., Li, T., Wei, B., Sun, J., ... & Zhong, W. (2020). Structural characteristics and anti-complement activities of polysaccharides from Sargassum hemiphyllum. Glycoconjugate Journal, 37(5), 553-563.
- 48- **Kazatchkine, M.**, Fischer, E., & Nydegger, U. (1982, March). Activation de la voie alterne du complément par les surfaces biologiques. In Annales de l'Institut Pasteur/Immunologie (Vol. 133, No. 2, pp. 181-188). Elsevier Masson.
- 49- **Kerboua, K. E.**, & **Djenouhat, K.** (2020). Semi-solid phase assay for the alternative complement pathway activity assessment (AP100). Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 41(2), 144-151.
- 50- **Kruse, Mahood, E. H. L. H.**, & Moghe, G. D. (2020). Machine learning: A powerful tool for gene function prediction in plants. Applications in Plant Sciences, 8(7), e11376.
- 51- **Kulasekararaj, A. G.**, Hill, A., Rottinghaus, S. T., Langemeijer, S., Wells, R., Gonzalez-Fernandez, F. A., ... & Peffault de Latour, R. (2019). Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 133(6), 540-549.
- 52- **Labro, M. T.** (2006). Immunomodulation médiée par les agents antibactériens. Réanimation,
- 53- **Laurent, P.**, Razafindralambo, H., & Paquot, M. (2011). Etude des interactions membranaires de dérivés de l'acide glucuronique par calorimétrie à titrage isotherme.
- 54- **Law, S. K.**, & Reid, K. B. M. (1995). Complement, in Focus Series.
- 55- **Lee, Y. K.**, Jung, S. K., & Chang, Y. H. (2020). Rheological properties of a neutral polysaccharide extracted from maca (Lepidium meyenii Walp.) roots with prebiotic

- and anti-inflammatory activities. *International journal of biological macromolecules*, 152, 757-765.
- 56- **Leonardi, L.**, La Torre, F., Soresina, A., Federici, S., Cancrini, C., Castagnoli, R., ... & Immunology Task Force of the Italian Society of Pediatric Allergy and Immunology (SIAIP). (2022). Inherited defects in the complement system. *Pediatric Allergy and Immunology*, 33, 73-76.
- 57- **Liu.,** Zhen-Zhen, Hong-Bo, W. E. N. G., Zhang, L. J., Ling-Yu, P. A. N., Wei, S. U. N., Hai-Xia, C. H. E. N., ... & Hong, L. I. (2019). Bupleurum polysaccharides ameliorated renal injury in diabetic mice associated with suppression of HMGB1-TLR4 signaling. *Chinese journal of natural medicines*,
- 58- **Locksley, R. M.**, Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
- 59- **Maheswari, A. U.**, Dewangan, Y. K., & Kumar, S. (2022). Effect of different row arrangement of linseed (*Linum usitatissimum* L.) and chandrasur (*Lepidium sativum* L.) sole and intercropping system on growth pattern, seed yield and linseed equivalent yield in Chhattisgarh plains
- 60- **Makrides, S. C.** (1998). Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacological reviews*, 50(1), 59-88.
- 61- **Mali, R. G.**, Mahajan, S. G., & Mehta, A. A. (2007). *Lepidium sativum* (Garden cress): a review of contemporary literature and medicinal properties. *Advances in Traditional Medicine*, 7(4), 331-335
- 62- **Martel, C.** (2005). Activation du système du complément dans les syndromes coronariens aigus.
- 63- **Michaud, P.**, Kemassi, A., Khelil, A. O. E. H., Boual, Z., & El Hadj, M. D. O. (2011). Partial characterization of water soluble polysaccharides extracted from one saharian medicinal plant: *Malva aegyptiaca* L. In *Proceedings International Conference on Biology. Environ. Chem* (Vol. 24, pp. 420-424).
- 64- **Michel-Souzy, S.** (2017). Etude du système de sécrétion de type II Xcp de *Pseudomonas aeruginosa*: vers une meilleure compréhension de la machinerie et de sa dynamique (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).
- 65- **Miller,** Wang, Y., Nanda, V., Dizenzo, D., Ye, J., Xiao, S., Kojima, Y., ... & Leeper, N. J. (2020). Clonally expanding smooth muscle cells promote atherosclerosis by escaping efferocytosis and activating the complement cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(27), 15818-15826.
- 66- **Monfort-Gouraud, M.**, Vignon, C., Vincens, A., Blouin, J., Frémeaux-Bacchi, V., & Talon, P. (2006). Déficit homozygote en facteur I du complément révélé par une infection systémique répétée à *Streptococcus pneumoniae*. *Archives de pédiatrie*, 13(8), 1125-1128.
- 67- **Morgan, B. P.** (2000). The complement system: an overview. *Complement methods and protocols*, 1-13.
- 68- **Murakami, T.**, Cardones, A. R., & Hwang, S. T. (2004). Chemokine receptors and melanoma metastasis. *Journal of dermatological science*, 36(2), 71-78.

- 69- **Nita, R. D.**, Ashok, B. K., & Ravishankar, B. (2013). EVALUATION OF ANTIARTHRITIC ACTIVITY OF LEPIDIUM SATIVUM LINN SEEDS AGAINST FREUND'S ADJUVANT INDUCED ARTHRITIS IN RATS. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 2(7), 532.
- 70- **Pugsley, M. K.**, Abramova, M., Cole, T., Yang, X., & Ammons, W. S. (2003). Inhibitors of the complement system currently in development for cardiovascular disease. *Cardiovascular Toxicology*, 3(1), 43-69.
- 71- **Raval, N.** (2016). A comprehensive review of *Lepidium sativum* Linn, a traditional medicinal plant. *World J Pharm Pharm Sci*, 5, 1593-601.
- 72- **Razmkhah, S.**, Razavi, SMA et Mohammadifar, MA (2016). Purification de la gomme de graines de cresson (*Lepidium sativum*): Une étude rhéologique complète. *Hydrocolloïdes alimentaires* ,
- 73- **Ripoche, J.**, Demares, M. J., Julen, N., Lemercier, C., Dauchel, H., Davrinche, C., ... & Fontaine, M. (1989). Les protéines régulatrices du système du complément.
- 74- **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).
- 75- **Samuelsen AB** (1998): Polysaccharides in *Plantago major* L. Studies of Structure and Biological Activity. Ph.D. Thesis, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, University of Oslo
- 76- **Sang, Hu, J.**, Van den Steen, PE, Sang, QXA et Opendakker, G. (2007). Inhibiteurs de la métalloprotéinase matricielle comme traitement des maladies inflammatoires et vasculaires. *Revue de la nature Découverte de médicaments* ,
- 77- **Sarma, J. V.**, & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and tissue research*, 343(1), 227-235.
- 78- **Sruthi, S.**, Majumder, S., Kumari, S., Kavya, T. S., & Padmaa, M. (2017). A review on medicinal plants used as diuretics from Karnataka state. *WJPP S*, 6, 513-536.
- 79- **Vaisar, T.**, Pennathur, S., Green, PS, Gharib, SA, Hoofnagle, AN, Cheung, MC, ... & Heinecke, JW (2007). La protéomique du fusil de chasse implique l'inhibition de la protéase et l'activation du complément dans les propriétés anti-inflammatoires des HDL. *Le Journal d'investigation clinique*.
- 80- **Wadhwa, S.**, Panwar, M. S., Agrawal, A., Saini, N., & Patidar, L. P. L. (2012). A Review on pharmacognostical study of *lepidium sativum lepidium sativum*. *ARPB*, 2(4), 316323.
- 81- **Wang, W.**, Zou, Y., Li, Q., Mao, R., Shao, X., Jin, D., ... & Wu, X. (2016). Immunomodulatory effects of a polysaccharide purified from *Lepidium meyenii* Walp. on macrophages. *Process Biochemistry*, 51(4), 542-553.
- 82- **Wiert, C.** (2006). *Ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific* (pp. 1-50). New Jersey: Humana Press. doi, 10, 978-1.
- 83- **Willrich, M. A.**, Ladwig, P. M., Martinez, M. A., Sridharan, M. R., Go, R. S., Murray, D. L., ... & at the Mayo, D. O. G. (2021). Monitoring Ravulizumab effect on complement assays. *Journal of Immunological Methods*, 490, 112944.

- 84- **Xiong, L.**, Ouyang, K. H., Jiang, Y., Yang, Z. W., Hu, W. B., Chen, H., ... & Wang, W. J. (2018). Chemical composition of Cyclocarya paliurus polysaccharide and inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 macrophage. *International journal of biological macromolecules*, 107, 1898-1907.
- 85- **Xu, C.**, Mao, D., Holers, VM, Palanca, B., Cheng, AM et Molina, H. (2000). Rôle critique du régulateur du complément murin dans la tolérance foëto-maternelle. *Sciences*,
- 86- **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
- 87- **Yamada, H.**, Kiyohara, H, Cyong, J, et al. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. *Planta medica*, 1989
- 88- **Zhan, R.**, Xia, L., Shao, J., Wang, C., & Chen, D. (2018). Polysaccharide isolated from Chinese jujube fruit (*Zizyphus jujuba* cv. Junzao) exerts anti-inflammatory effects through MAPK signaling. *Journal of Functional Foods*, 40, 461-470.
- 89- **Zhang C.**, Schubart, A., Anderson, K., Mainolfi, N., Sellner, H., Ehara, T., Adams, C. M., ... & Eder, J. (2019). Small-molecule factor B inhibitor for the treatment of complement-mediated diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(16), 7926-7931.
- 90- **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.
- 91- **Zhang, M.**, Wang, J., Wang, L., Zhou, H., Liang, X. D., M. T., Tang, Y. X., ... & Mao, J. L. (2021). The isolation, structural features and biological activities of polysaccharide from *Ligusticum chuanxiong*: A review. *Carbohydrate Polymers*, 118971.
- 92- **Zhao, J. F.**, Kiyohara, H., Matsumoto, T., & Yamada, H. (1993). Anti-complementary acidic polysaccharides from roots of *Lithospermum euchromum*. *Phytochemistry*, 34(3), 719-724.
- 93- **Zuber, J.**, Fakhouri, F., Roumenina, L. T., Loirat, C., & Frémeaux-Bacchi, V. (2012). Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nature Reviews Nephrology*, 8(11), 643-657.

Annexes

Annexes

I.- Extraction des polysaccharides

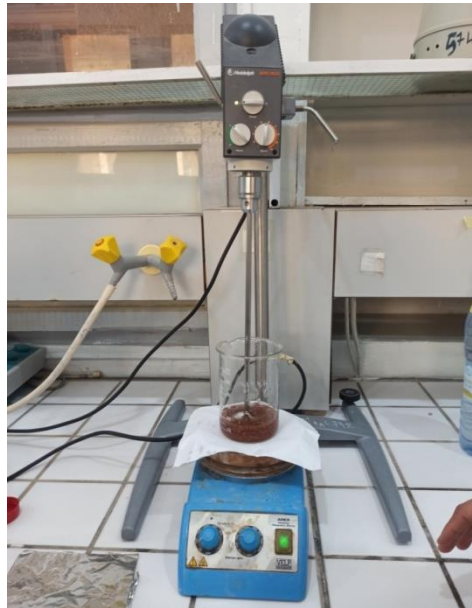


Figure 1 : Homogénéisation des graines de *Lepidium sativum*L à l'aide d'un agitateur à pales au cours de l'extraction.



Figure 2 : Mélange visqueux de graines et de mucilage.



Figure 3 : Filtration des polysaccharides à travers un tissu à mailles fines.

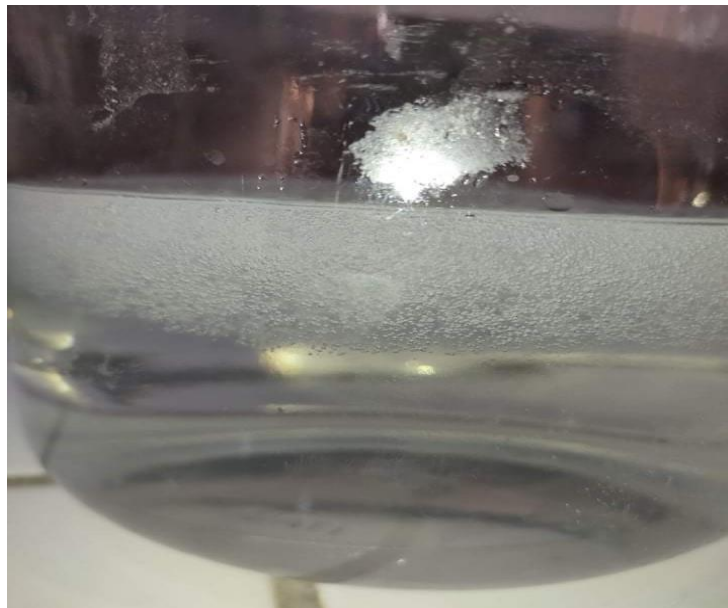


Figure 4 : Précipitation des polysaccharides par 3 volumes d'éthanol pendant 24h.

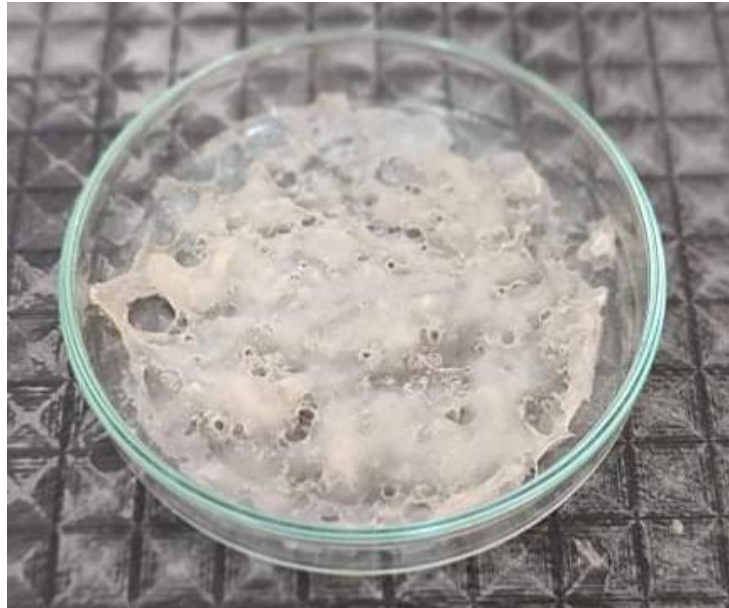


Figure 5 : Séchage des polysaccharides à l'étuve à 40°C.



Figure 6 : Broyage à main des polysaccharides en poudre fines préservés ensuite dans un Eppendorf.

II.- Hydrolyse des liaisons osidiques



Figure 7: Hydrolyse acide partielle par l'acide trifluoro acétique (TFA) de mucilage des graines *Lepidium sativum*L.



Figure 8 : Evaporation de TFA dans une boîte de pétri de petit volume sous la hotte après l'ajout de quelques gouttes de méthanol aux hydrolysats.

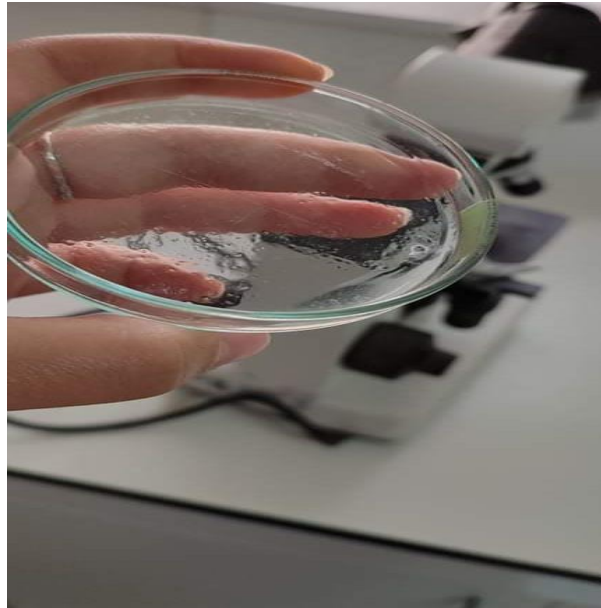


Figure 9 : Récupération des fractions des oligosaccharides après l'évaporation de TFA dans 1ml d'eau ultrapure.

III.- Test AP100



Figure 10 : Ajustement de PH de la solution tampon de PBS à PH : 7,4 .



Figure 11 : Solutions tampons utilisées.

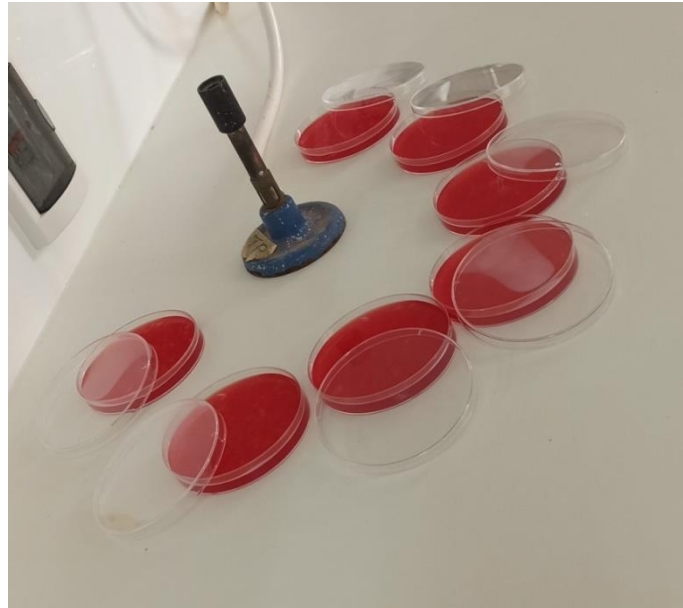


Figure 12 : Préparation des boîtes d'AP100 à partir le mélange de Gel fondu + Tampon ACP avec suspension des érythrocytes humain.

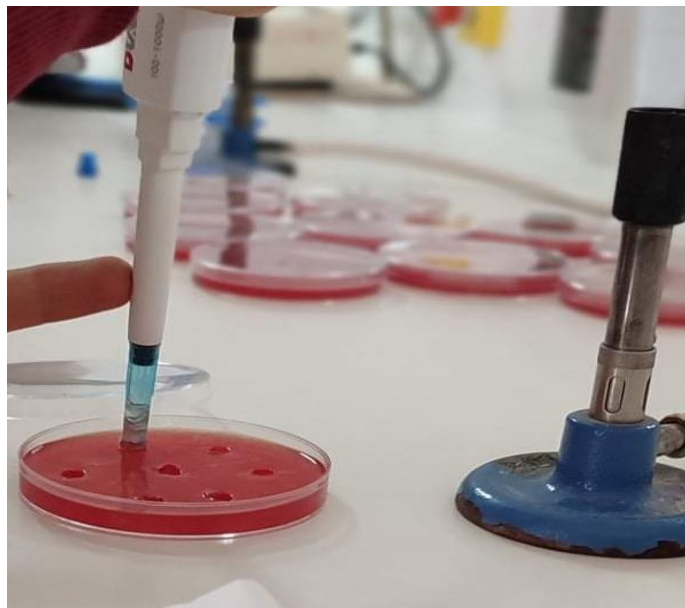


Figure 13 : Formation de 7 puits à l'aide d'une dans chaque boîte.



Figure 14 : Ajout de sérum humain normal, oligosaccharides et l'héparine dans chaque puit des boites du test hémolytique AP100.

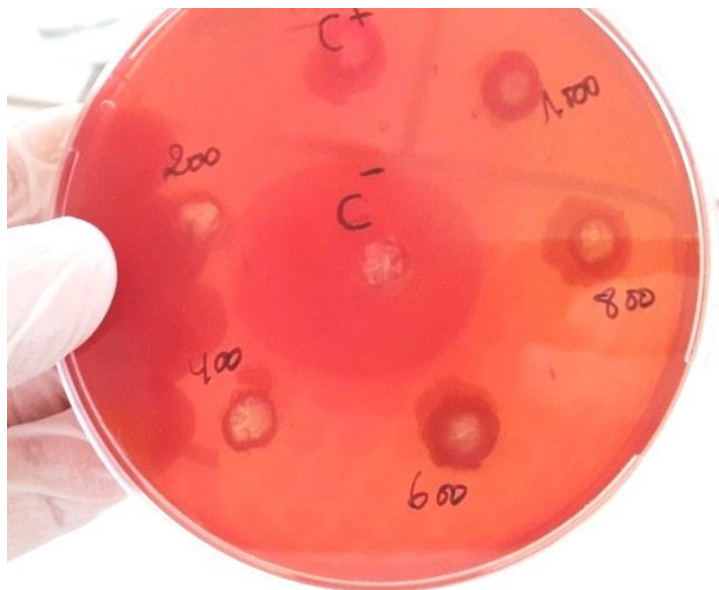


Figure 14 : Zones de lyse des hématies par le complément contenu dans le sérum humain normal en présence des oligosaccharides et en utilisant l'héparine comme contrôle positif et le sérum comme contrôle négatif.

Répétition 1		Moyenne de diamètre (D)	Rayon (r)	Surface de la lyse	Pourcentage de la lyse %	Pourcentage d'inhibition %
Contrôle négatif		1.5	0.75	1.7662	100	0
Contrôle positif		0.95	0.475	0.7085	40.11	59.88
Oligosaccharides µg/ml	200	/	/	/	/	/
	400	/	/	/	/	/
	600	1.35	0.675	1.4306	80.99	19.01
	800	1.2	0.6	1.1304	64	36
	1000	1.15	0.575	1.0381	58.77	41.25

Répétition 2		Moyenne de diamètre (D)	Rayon (r)	Surface de la lyse	Pourcentage de la lyse %	Pourcentage d'inhibition %
Contrôle négatif		1.45	0.725	1.6505	100	0
Contrôle positif		0.9	0.45	0.6358	38.52	61.47
Oligosaccharides µg/ml	200	1.4	0.7	1.5386	93.22	6.78
	400	1.35	0.675	1.4306	86.67	13.33
	600	1.2	0.6	1.1304	68.48	31.52
	800	1.15	0.575	1.0381	62.88	37.12
	1000	1	0.5	0.785	47.56	52.43

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude de l'activité anti-complément des Oligosaccharides obtenus par hydrolyse partielle des polysaccharides hydrosolubles issus des graines d'une plante spontanée à caractère médicinal, il s'agit de *Lepidium sativum* Lin (Brassicaceae). L'exploration du test anti-complément via la technique hémolytique AP100 ; on utilisant des boîtes Pétri contenant du gel d'agarose et des érythrocytes ; consiste à déterminer la concentration des oligosaccharides capable d'inhiber 100% de lyse des hématies provoquée par l'activation de la voie alterne du complément contenu dans le sérum humaine normale. Les résultats suggèrent que, les oligosaccharides de *Lepidium sativum* Lin possèdent une activité anti-complément dose dépendante. Ces oligomères inhibent 46,75% de l'activation de la voie alterne du complément présentée par la lyse des hématies à une concentration 1000µg/ml tandis que l'héparine ; un oligosaccharide sulfaté utilisé comme contrôle positif ; montre un taux inhibition de 60,52% avec la même concentration. Ces résultats sont comparés avec des études antérieures qui ont montré que les oligosaccharides présentent des puissantes activités anti complément donc on peut conclure que les polysaccharides issus de *Lepidium sativum* Lin (Brassicaceae) peuvent être utilisés comme des inhibiteurs de la voie alterne du complément.

Mots clés : *Lepidium sativum* , Oligosaccharides, Anti-complément, Technique hémolytique AP100, Voie alterne.

ملخص

السكريات المستخرجة من النباتات الطبية لها أنشطة بيولوجية مختلفة مثل النشاط المضاد للالتهابات ومضادات الأكسدة وكذلك النشاط المضاد للمتمم. يركز عملنا على دراسة تثبيط نشاط المتمم بواسطة السكريات القابلة للذوبان في الماء (polysaccharides) المستخلصة من بذور نبتة حب الرشاد *Lepidium sativum* Lin (Brassicaceae)، وهي نبتة ذات ميزة طبية من عائلة (Brassicaceae)، 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 طبق pétrie تحتوي على هلام agarose و كريات الدم الحمراء حيث تم تحضير سلسلة من التخفيفات لأجزاء من polysaccharides وتخفيف 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 oligosacchrides مع نشاط تثبيط héparine ، oligosacchrides بتركيز 1000 ميكروغرام / مل يعطي معدل تثبيط يعادل 46,75% وهو قريب من معدل تثبيط 60,52% في نفس التركيز ؛ تمت مقارنة هذه النتائج مع الدراسات السابقة التي أظهرت أن متعدد السكريات المستخلص من بذور نبتة حب الرشاد له نشاط مهم مضاد للمتمم ، ويمكن استخدامه كمثبط للمتمم.

الكلمات المفتاحية: حب الرشاد، متعدد السكريات ، مضاد للمتمم، تقنية AP100 ، Voie alterne.

Abstract

Lepidium sativum Lin (Brassicaceae) is a 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 *Lepidium sativum* Lin (Brassicaceae). 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, *Lepidium sativum* polysaccharide possesses dose-dependent anti-complement activity. Polysaccharide inhibits 46,75% 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 60,52% 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 *Lepidium sativum* Lin (Brassicaceae) can be used as a therapeutic inhibitor of the alternative complement pathway.

Keywords: *Lepidium sativum* , Oligosaccharides, Anti-complément, Technique hémolytique AP100, Voie alterne.