UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES ET SCIENCES DE L'INGÉNIEUR

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N° d'ordre……
N° de série……

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

en Biologie

Option : Biochimie et Analyse des Bio-produits

Par BOUAL Zakaria

THÈME

Contribution à l'étude des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien)

Soutenu publiquement le 26/01/2009

Devant le jury :

Président	HADJ MAHAMMED M.	Prof	Univ. Ouargla
Encadreur	OULD EL HADJ M. D.	MC	Univ. Ouargla
Examinateur	BISSATI S.	MC	Univ. Ouargla
Examinateur	OULD EL HADJ-KHELIL A.	MC	Univ. Ouargla
Invité	BENSACI M. B.	MACC	Univ. Ouargla

Année universitaire 2007/2008

Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie Dieu « Tout Puissant » pour ce qu'il m'a donné comme force pour effectuer ce travail.

J'adresse une profonde reconnaissance à Monsieur OULD ELHADJ Mohamed Didi, maître de conférences au département de biologie à la faculté des sciences et science de l'ingénieur de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, qui a encadré ce travail depuis les premiers instants. Sa pédagogie, son écoute, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique, ont été importants pour moi que ses connaissances éclectiques et ont largement contribué à l'évolution de cette étude.

J'exprime toute ma profonde gratitude à Monsieur Philippe MICHAUD, Professeur à l'université Blaise Pascal- Clermont Ferrand (France), sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Je le remercie vivement pour son soutien, qui m'a permis d'atteindre les objectifs visés. Je le remercie encore pour son co-encadrement, sa disponibilité et les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eu à échanger.

Je remercie Monsieur HADJ MAHAMMED Mahfoud, Professeur au département de chimie à la faculté des sciences et sciences de l'ingénieur de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements s'adressent également Madame BISSATI Samia, maître de conférences au département de biologie à la faculté des sciences et science de l'ingénieur de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, et Madame OULD ELHADJ – KHELIL Aminata, maître de conférences au département de biologie à la faculté des sciences et science de l'ingénieur de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, pour avoir accepté d'examiner ce travail,

A monsieur BENSACI Messaoud Bacha Ara, maître assistant chargé de cours au département de biologie à la faculté des sciences et science de l'ingénieur de l'université Kasdi Merbah-Ouargla qui me fait l'honneur d'être invité.

Je tiens à remercier le Laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi arides, en particulier son directeur, Pr. DADDA MOUSSA Belkhir de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire.

Je remercie le laboratoire de recherche Biogéochimie en premier son directeur Pr. HADJ MAHAMMED Mahfoud., pour m'avoir permis de mener cette étude à la frontière de la chimie et de la biochimie.

Je remercie Dr. AMISAID Mustapha, directeur du laboratoire de la clinique des Oasis GHARDAIA, pour les tests en bactériologie.

Je n'oublie pas les étudiants de Post-Graduation de Biochimie et Analyse des Bioproduits, de plus en plus nombreux et tant mieux, que chacun d'eux trouve ici un remerciement particulier.

Enfin, tout ceci n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille et de mes amis, bien qu'ils l'ignorent sûrement. J'espère que ces quelques mots répareront cette erreur.

A mes parents : « merci, cette thèse est la vôtre ».

Abréviations

Ara: arabinose
Fru: fructose
Gal A: acide galacturonique
Gal: galactose
Glc A: acide glucoronique
Glc: glucose
Man: mannose
PAD: Détection Ampérométrique Pulsée
Rha: rhamnose
Xyl: xylose

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Position systématique et usages thérapeutiques des espèces de plantes spontanées à caractère médicinal choisies dans la région de Ghardaïa (BATTANDIER, 1882; TRABUT, 1935; OZENDA, 1983)	29
2	Détermination de l'ordre, de type, et de temps de rétention des monosaccharides standard	40
3	Composition des extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles des feuilles des plantes échantillonnées (*M. parviflora, A. tenuifolius, Z. lotus, R. vesicarius* et *P. notata*)	43
4	Composition en monosaccharides des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de différentes plantes échantillonnées, dans les 2 systèmes de phase mobile 1 et 2 en CCM (M*: M. parviflora*, A: *A. tenuifolius*, R: *R. vesicarius*, Z: *Z. lotus* et P: *P. notata*)	60

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	*Malva parviflora* (Malvaceae) de l'Oued Touzouz de la région de Ghardaïa (Photo Originale)	30
2	*Asphodelus tenuifolius* (Liliaceae) de l'Oued Nechou de la région de Ghardaïa (Photo Originale)	30
3	*Rumex vesicarius* (Polygonaceae) de l'Oued Laadira de la région de Ghardaïa (Photo Originale)	31
4	*Zizyphus lotus* (Rhamnaceae) de l'Oued Akhelkhal de la région de Ghardaïa (Photo Originale)	31
5	*Plantago notata* (Plantaginaceae) de l'Oued Nechou de la région de Ghardaïa (Photo Originale)	32
6	Compositions des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles de feuilles des plantes échantillonnées	45
7	Spectre Infrarouge de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *Malva parviflora.*	48
8	Spectre Infrarouge de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de l'*Asphodelus tenuipholius*	49
9	Spectre Infrarouge de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *Zizyphus lotus*	50
10	Spectre Infrarouge de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *Rumex vesicarius*	51
11	Spectre Infrarouge de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata*	52

12	Caractérisation par CCM des hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des différentes plantes spontanées à caractère médicinal par l'acide trifluoroacétique, 2 M pendant 5 heures à 100°C	54
13	Caractérisation par CCM des hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des différentes plantes spontanées à caractère médicinal par l'acide trifluoroacétique, 4 M pendant 5 heures à 100°C	54
14	Caractérisation par CCM des hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des différentes plantes spontanées à caractère médicinal par l'acide trifluoroacétique, 4 M à 80°C pendant 5 heures	55
15	Suivi par CCM de l'hydrolyse en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *M. parviflora* par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C	56
16	Suivi par CCM de l'hydrolyse en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles feuilles de d'*A. tenuifolius* par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C	56
17	Suivi par CCM de l'hydrolyse en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *Z. lotus* par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C	57
18	Suivi par CCM de l'hydrolyse en fonction du temps (en heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *R. vesicarius* par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C	58
19	Suivi par CCM de l'hydrolyse en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *P. notata* par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C	58
20	Caractérisation par CCM des hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de différentes plantes spontanées à caractère médicinal par l'acide trifluoroacétique, 4 M à 80°C pendant 5 heures	59

21	Chromatogramme de l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles extrait des feuilles de *Malva parviflora* par HPAEC-PAD	62
22	Chromatogramme de l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles extrait des feuilles d'*Asphodelus tenuifolius* par HPAEC-PAD	63
23	Chromatogramme de l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles extrait des feuilles de *Zizyphus lotus* effectué par HPAEC-PAD	64
24	Composition en monosaccharides des polysaccharides hydrosolubles extraits à partir des feuilles des plantes: *Malva parviflora, Asphodelus tenuifolius,* et *Zizyphus lotus* par HPAEC-PAD	65
25	Croissance de *Klebsiella pneumonea pneumonea* après 24 heures en milieu de culture supplémenté par les hydrolysats partiels de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de plantes échantillonnées à différentes concentrations, suivi estimé par mesure des absorbances à 620 nm	69
26	Croissance de *Klebsiella pneumonea pneumonea* après 24, 48 heures de culture supplémenté par les hydrolysats partiels de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Rumex vesicarius* et de *Plantago notata* exprimée en absorbances mesurée à 620 nm	69

Liste des annexes

N°	Titre	Page
1	Méthode de détermination de la teneur en matière sèche	80
2	Méthodes de détermination des principaux constituants chimiques des extraits bruts des polysaccharides	80
3	Méthode de Spectrométrie Infrarouge	83
4	Méthodes de détermination de la composition qualitative et quantitative des oses constitutifs des polysaccharides	83
5	Méthode de mesure de l'activité biologique	85

Table de matière

Introduction **01**

Chapitre I- Aperçu général sur les glucides

I.1.- Généralités sur les glucides 03
1.1.1.- Oses 03
1.1.1.1.- Oses neutres 03
1.1.1.2.- Osamines 03
1.1.1.3.- Acides uroniques 04
1.1.1.4.- Acides sialiques 04
1.1.2.- Osides 04
1.1.2.1.- Holosides 05
1.1.2.1.1.- Diholosides 05
1.1.2.1.2.- Oligoholosides 05
1.1.2.1.2.1.- Oligoholosides végétaux 06
1.1.2.1.2.2.- Oligoholosides animaux 07
1.1.2.1.3.- Polysaccharides 08
1.1.2.1.3.1.- Polysaccharides bactériens et fongiques 08
1.1.2.1.3.2.- Polysaccharides d'extraits d'algues 10
1.1.2.1.3.3.- Polysaccharides animaux 11
1.1.2.1.3.4.- Polysaccharides végétaux 12
1.1.2.1.3.4.1.- Polysaccharides de réserve 12
1.1.2.1.3.4.2.- Polysaccharides de structures 16
1.1.2.1.3.4.3.- Exsudats et mucilages 20
1.1.2.1.3.4.3.1.- Exsudats 21
1.1.2.1.3.4.3.2.- Mucilages 23
1.1.2.2.- Hétérosides 26

Chapitre II- Méthodologie de travail

2.1.- Présentation de la zone d'étude 27
2.2.- Principe d'étude 27
2.3.- Matériel d'étude 28
2.3.1.- Choix des plantes 28
2.3.2.- Echantillonnage des espèces végétales 32
2.3.3.- Technique de séchage 33
2.4.- Etude des polysaccharides 33
2.4.1.- Extraction des polysaccharides 33

2.4.2.- Composition des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles 34
2.4.2.1.- Détermination de la teneur en matière sèche 34
2.4.2.2.- Détermination de l'humidité 34
2.4.2.3.- Détermination de la teneur en cendres totales 34
2.4.2.4.- Dosage des protéines 35
2.4.2.5.- Dosages des oses neutres et des oses acides 35
2.4.3. - Caractérisation des polysaccharides 36
2.4.3.1. - Analyse Infrarouge 36
2.4.3.2. - Caractérisation des résidus glycosidiques 36
2.4.3.2.1.- Hydrolyse des liaisons glycosidiques 36
2.4.3.2.2.- Chromatographie sur couche mince des résidus glycosidiques 37
2.4.3.2.3.- Chromatographie échangeuse d'anions de haute performance (HPAEC) à détection ampérométrique pulsée (PAD) des résidus glycosidiques 37
2.4.4. - Activité biologique des hydrolysats de polysaccharides 40
2.4.4.1. - Souche bactérienne 41
2.4.4.2. - Milieu de culture 41

Chapitre III- Résultats et discussions

3.1.- Caractérisation des extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de différentes plantes échantillonnées 42
3.2.- Caractérisations des polysaccharides des extraits bruts des différentes plantes échantillonnées 47
3.2.1.- Groupements fonctionnels caractéristiques des polysaccharides 47
3.2.2.- Caractérisation qualitative des résidus glycosidiques 53
3.2.3.- Détermination de la composition en oses constitutifs par HPAEC-PAD 61
3.3.- Effets biologiques des oligosaccharides issus des extraits polysaccharidiques sur *Klebsiella pneumonea pneumonea* 66

Conclusion 70

Références bibliographiques 72

Annexes 80

Résumé

INTRODUCTION

Les polysaccharides sont connus et exploités depuis de nombreuses années par l'industrie, à cause de leur abondance, leurs sources renouvelables, non-toxiques, biodégradables, et origine de plusieurs produits dérivés, après modifications chimiques et biochimiques (ZOHURIAAN et SHOKROLAHI, 2004). Les polysaccharides ne sont pas seulement utilisés comme réserves énergétiques par les être vivants, mais également pour assurer de nombreuses fonctions biologiques (GENESTIE, 2006). Ils représentent une classe très intéressante de produits actifs, et sont identifiés comme composés multifonctionnels, avec plusieurs activités pharmacologiques (DETERS et *al*., 2005). Ils peuvent être extraits de nombreux organismes, tels que les micro-organismes (xanthane, scléroglucane,…), les algues (alginate, carraghénane,…), les crustacés (chitine), les mammifères (héparine, chondroïtine sulfate,…) et les végétaux supérieurs (WARRAND, 2004). Les polysaccharides issus de cette dernière classe d'êtres vivants présentent une variabilité structurale et une richesse de propriétés physico-chimiques, que l'on ne rencontre chez aucune autre classe d'organismes (WARRAND, 2004). Les herbes officinales, contenant des polysaccharides sont largement utilisées pour le traitement des maladies dans la médecine traditionnelle et moderne, comme *Linum usitatissimum* (lin), utilisé dans le cas de constipation ou de troubles fonctionnels du colon, action émolliente et calmante (anti-inflammatoire) d'*althaea rosea*, activité hypoglycémique d'*Hibiscus moscheutos*, etc. Ces espèces appartiennent à des familles botaniques caractéristiques, comportant des cellules spécialisées, dites cellules mucilagineuses ou cellules à mucilages sécrétrices de polysaccharides. Ces cellules sont présentes dans différents organes végétaux (WARRAND, 2004). Le mucilage est déposé dans des couches concentrées de compartiments extracytoplasmiques. Les rôles des mucilages sont très divers, notamment l'exposition des cellules à mucilage à la surface des organes végétaux, semblent indiquer leurs rôles protecteurs, en outre, leurs caractéristiques hygroscopiques et épaississants recouvrent toutes les autres fonctions (MATTHEWS et ENDRESS, 2006).

Depuis plusieurs années, un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles sources de molécules végétales, afin de mettre au point de nouveaux principes actifs ou de découvrir des analogues de structures des molécules existantes (DETERS et *al*., 2005). Cependant, la flore spontanée à caractère médicinal du Sahara Septentrional Est algérien, ainsi que les relations entre l'homme dans cette bande aride, et les espèces végétales méritent une attention particulière dans cette zone saharienne.

Face à ce constat, le présent travail s'oriente sur l'étude des polysaccharides de plantes spontanées, à caractère médicinal de la région de Ghardaïa. L’objectif recherché,

vise une contribution à élargir le spectre des composés biologiques actifs, et d'identifier de nouvelles sources de polysaccharides qui pourront devenir des substituts de drogues synthétiques.

La présente étude s’articule autour de trois parties. Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique, rappelant le rôle et l’intérêt des poly- et oligosaccharides. Dans un second chapitre, il est décrit les principales techniques d’extraction des polysaccharides hydrosolubles à partir des feuilles des espèces échantillonnées; l’identification de la composition globale des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles. Il est question de la caractérisation qualitative et quantitative des oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles. Une contribution à l'étude de l'effet prébiotique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des polysaccharides hydrosolubles sur *Klebsiella pneumonea pneumonea* est entreprise. Un troisième chapitre présente les principaux résultats obtenus, suivis d’une discussion. Une conclusion générale et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achèvent ce travail.

Chapitre I.
Aperçu général sur les glucides

I.1.- Généralités sur les glucides

Les glucides sont des constituants des organismes vivants parfois appelés hydrates de carbone. ALAIS et LINDEN (1997) notent que cette dénomination est à proscrire, car la formule générale $C_n(H_2O)_n$ n'est pas valable pour tous les glucides. Ce sont en première approximation des composés organiques carbonylés (aldéhydiques ou cétoniques) polyhydroxylés et éventuellement carboxylés ou aminés (BRUNETON, 1999). WEIL (2005) distinguent les oses simples et les osides dont l'hydrolyse livre plusieurs oses.

1.1.1.- Oses

Les oses sont des glucides non hydrolysables comportant à la fois plusieurs fonctions alcooliques, une fonction réductrice aldéhydique ou cétonique et plusieurs carbones asymétriques, permettant la formation d'isomères (PARIS et HURABIELLE, 1981; WEIL, 2005). Le nombre d'isomères possibles d'un composé dépend du nombre d'atomes de carbones asymétriques (MURRAY et *al.*, 1999). La présence d'atomes de carbone asymétriques, confère une activité optique au composé. Les oses sont divisés en quatre catégories: les oses neutres, les osamines, les acides uroniques et les acides sialiques (WEIL, 2005).

1.1.1.1.- Oses neutres

Parmi les oses neutres, se classent les oses qui ne possèdent outre la fonction aldéhydique ou cétonique que des fonctions alcooliques(WEIL, 2005).

1.1.1.2.- Osamines

Les osamines dérivent des oses par remplacement d'un hydroxyle qui est généralement celui porté par le carbone 2, par une fonction amine fréquemment acétylé. Ils se rencontrent souvent dans les polysaccharides bactériens (muréine) (WEIL, 2005), des arthropodes et des crustacés (chitine). Ce sont des éléments constitutifs des glycoprotéines animales. Ils sont présents chez certains champignons, mais rares chez les végétaux supérieurs (BRUNETON, 1999).

1.1.1.3.- Acides uroniques

Les acides uroniques sont les produits d'oxydation des hexoses par des déshydrogénases spécifiques. La fonction alcool primaire est oxydée en acide carboxylique. Les acides D-glucuroniques et D-galacturoniques, sont des constituants habituels des polysaccharides pariétaux en particulier de la pectine, des mucilages acides et de la plupart des sécrétions polysaccharidiques comme la gomme de Sterculia (BRUNETON, 1999). L'acide glucuronique participe aux processus d'élimination des substances étrangères à l'organisme (xénobiotiques), qu'elles soient ou non toxiques (ALLIIET et LALEGERIE, 1997).

Certains acides moins fréquents comme L-guluronique (D-gulose épemère en C_3 et en C_4 du D-glucose) constitutif de certains polysaccharides acides des algues (*Fucus serratus* L. et *F. vesiculosi*s L. de la famille des Fucaceae), comme l'acide alginique. L'acide alginique est un polymère linéaire construit à partir de deux acides uroniques, l'acide D-mannuronique et de l'acide (BRUNETON, 1999).

1.1.1.4.- Acides sialiques

Les acides sialiques sont des dérivés N- ou O-acétylés de l'acide neuraminique. L'acide neuraminique est un ose à neuf atomes de carbone qui dérive de la mannosamine et du pyruvate (MURRAY et *al.,* 1999). Les différentes acétylations, conduisant à divers acides sialiques portent sur des hydroxyles (notamment en carbone 4 et en carbone 7) (WEIL, 2005). Les acides sialiques sont des constituants des glycoprotéines et des glycolipides (MURRAY et *al.,* 1999). Actuellement plus de 50 acides sialiques qui différent par la nature des substituants de la fonction $-NH_2$ et des fonctions –OH sont connus (WEIL, 2005).

1.1.2.- Osides

Les osides résultent de la combinaison, par l'intermédiaire de liaisons dites osidiques, de plusieurs molécules d'oses (holosides), ou d'oses avec les composés non glucidiques (hétérosides) (BRUNETON, 1999).

1.1.2.1.- Holosides

L'hydrolyse des holosides ne libère que des oses. Selon le nombre de molécules d'oses libéré lors de l'hydrolyse, on distingue les diholosides, les oligoholosides ou les oligosaccharides renfermant moins de dix oses et les polyosides ou les polysaccharides avec plus de dix oses (WEIL, 2005).

1.1.2.1.1.- Diholosides

Les diholosides résultent de la formation de liaison osidique entre deux molécules d'oses. On distingue, selon la façon dont sont liées les deux molécules d'oses, deux types de diholosides naturels (WEIL, 2005).

- **Diholosides réducteurs :** La fonction semi acétalique de l'un des oses, est engagée dans une liaison osidique avec un hydroxyle du deuxième ose. Le caractère réducteur du premier ose disparaît, mais celui du deuxième ose subsiste. Ceci confère un pouvoir réducteur à la molécule de diholoside. Le plus répondu est le lactose (WEIL, 2005).
- **Diholosides non réducteurs :** Les deux oses sont liés par leurs fonctions semi-acétaliques. Le diholoside n'a pas de pouvoir réducteur. Les plus répondus sont le saccharose et le tréhalose (WEIL, 2005).

1.1.2.1.2.- Oligoholosides

De nos jours, les oligoholosides ont été considérés comme source de nourriture diététique et leurs rôles biologiques étaient limités aux propriétés antigéniques des divers groupes sanguins (SAKSENA et *al.*, 1999; KOBATA, 2000). SAKSENA et *al.* (1999), rapportent que les divers composés glycosylés ou les glucides même méritent une attention comme composés biologiques actifs chez les animaux et chez l'homme en particulier. Car les streptomycines A et B sont des aminoglycosides isolés de *Streptomyces griseus*. Ils ont une activité tuberculostatique. De même la daunomycine est un anticancéreux de la famille des anthracyclines, synthétisé par les actinobactéries du genre Streptomyces. Elle est active dans les hémopathies malignes (leucémies et lymphomes) (SAKSENA et *al.*, 1999; VOGEL, 2007). VOGEL (2007) note que les antibiotiques de types aminosides comme la tiazofurine, présentent une activité antitumorale et antivirale; mais la néosidomycine agit contre les bactéries Gram-; par contre la ribavirine paraît un antiviral et anti-syndrome immunodéficience acquis (SIDA). Pour PIKULSKI et *al.* (2007) plus de la moitié des protéines des mammifères sont

glycosylées. Ces glycoprotéines représentent les mots nécessaires à la communication intercellulaire. Ces mots sont des oligoholosides attachés de façon covalente à des protéines. Les monosaccharides les plus importants qui interviennent dans cet "alphabet" sont le D-glucose, le D-galactose, le L-fucose (6-désoxy-D-galactose), la D-glucosamine, la D-galactosamine et l'acide neuraminique. Les résidus aminés sont très souvent acétylés comme l'acide N-acétyl-neuraminique appelé acide sialique (VOGEL, 2007). KOBATA (2000) et VOGEL (2007) signalent que la plupart des cellules cancéreuses humaines possèdent à leur surface des oligosaccharides qui diffèrent de celles que l'on trouve à la surface des cellules saines.

ROBIJN et *al.* (2007) notent que l'infection par *Schistosoma mansoni*, (Trématodes), peut être détectée par des oligoholosides spécifiques aux oeufs de ce parasite, libérés dans les urines des patients. L'intérêt des oligoholosides parasitaires dans la perspective de développer des vaccins et de nouvelles techniques de diagnostic des infections parasitaires (NYAME et *al.*, 2004).

Les oligoholosides présentent d'autres activités biologiques telles que des hypoglycémiants, des anti-compléments, des anti-inflammatoires et des anti-coagulants (SAKSENA et *al.*, 1999).

1.1.2.1.2.1.- Oligoholosides végétaux

Les oligoholosides représentent des formes de maturation des graines et de réserves spécifiques d'espèces ou de groupes végétaux restreintes, ce qui explique leur intérêt pour le chimiotaxonomiste (AMUTI et POLLARD, 1977; BRUNETON, 1999). Les plus fréquents sont les galactooligoholosides, les fructooligoholosides et les oligogalacturonides.

- Galactooligoholosides : Les galactooligosaccharides sont des dérivés galactosylés du saccharose, non réducteurs. Ils sont surtout stockés dans les graines et dans les organes souterrains. Parmi les plus fréquents se distinguent la raffinose, la stachyose, la verbascose, l'ajucose. Ils interviennent comme donneur du reste galactosyl dans la synthèse des glycolipides, lesquels jouent un rôle dans la stabilité des membranes des chloroplastes à basses températures (GUIGNARD, 1996). Ils représentent des formes de réserve spécifiques d'espèces ou de petits groupes végétaux. Cependant, les galactooligosaccharides sont en partie à l'origine des flatulences observées après la consommation de légumes secs comme le haricot, le pois chiche (BRUNETON, 1999).

- **Fructooligoholosides:** Les fructooligoholosides par définition short-chain fructooligoholosides (sc-FOSs), sont des chaînes linéaires de Glucosyl α(1→2) $(fructosyl)_n$ β(2→1) fructose polymère avec un degré de polymérisation entre n = 1 à n = 5. Elles sont présentes dans de nombreuses plantes alimentaires comme la chicorée (*Cichorium* sp. Astéraceae), l'oignon (*Allium cepa,* Liliaceae), le blé (*Triticum* sp., Poaceae), etc. Les fructooligoholosides et les polymères du fructose sont indigestibles par l'être humain. Elles sont totalement fermentées dans le colon en lactate, acides gras à courte chaîne (acétate, propionate et butyrate) et en H_2 et CO_2 (BORNET et *al.,* 2002; TIKAROVSKA et CHMELIK, 2004).

- **Oligogalacturonides :** Les oligogalacturonides sont des oligomères de l'acide α-D-galactopyranuronique 1, 4 liés, issus de la dégradation de l'homogalacturonane de calix des cellules végétales par des enzymes durant la pathogenèse de la plante. Selon la grandeur de l'oligoholoside, il peut avoir diverses fonctions biologiques, dont la stimulation de la croissance des fleurs, l'inhibition de croissance des racines ou encore la stimulation de la phosphorylation des protéines de surface, intervenant dans la défense de la cellule (VOGEL, 2007).

1.1.2.1.2.2.- Oligoholosides animaux

Dans le lait des mammifères, se retrouvent de nombreux oligoholosides, présentant à leurs extrémités réductrices un résidu de lactose (KOBATA, 2000; NAKAJIMA et *al.,* 2006). Ils sont en plus faibles quantités dans le lait des ruminants par rapport à celui de la femme qui contient plus de 100 oligoholosides (NAKAJIMA et *al.* 2006). Parmi les propriétés biologiques des oligoholosides animaux, il est à signalé leurs:

- Effets bifidogènes (BORNET et *al., 2*002; MARTINEZ-FEREZ et *al.,* 2006 ; KUNZ et *al.,* 2006),
- Propriétés anti-infectieuses (MARTINEZ-FEREZ et *al*, 2006);
- Propriétés antigéniques: Il existe une corrélation entre les oligoholosides du lait humain et le type de groupage sanguin (KOBATA, 2000; MARTINEZ-FEREZ et *al.,* 2006). Pour KOBATA (2000), les oligoholosides du lait humain sont formés par l'action des différentes glycosyl transférases sur le lactose. Ces dernières sont responsables de la formation des chaînes glucidiques des glycoprotéines et des glycolipides des récepteurs membranaires (SAKSENA et *al.,* 1999; KOBATA, 2000). MARTINEZ-FEREZ et *al.* (2006) signalent une grande homologie structurale entre les oligoholosides du lait humain et la copule glucidique des récepteurs membranaires. Il semble que les oligoholosides jouent un rôle de récepteurs mimétiques pour les microorganismes pathogènes

(MARTINEZ-FEREZ et *al.,* 2006). Une étude récente confirme cette hepothèse, des chaînes courtes des oligoholosides du lait humain inhibent l'adhésion des bactéries entériques virulents (KOBATA, 2000). Des études in vitro indiquent l'influence des oligoholosides du lait sur les microorganismes (KUNZ et *al.*, 2006).

1.1.2.1.3.- Polysaccharides

Les polysaccharides constituent l'une des familles les plus variées de biopolymères et leurs applications tant dans le domaine industriel que biologique sont innombrables. Ce sont des homo- ou hétéropolymères, d'oses neutres et/ou d'acides; de structure plus ou moins ramifiée, avec ou sans substitution par des groupements tel que l'acétate, le succinate, le pyruvate ou le sulfate. Leurs propriétés rhéologiques (gélifiantes, stabilisantes, émulsifiantes, épaississantes,…) sont mises à profit dans l'agro-alimentaire, l'industrie pétrolière, la cosmétique, les peintures, les adhésifs, les biomatériaux, etc. Leur biocompatibilité confère à ce groupe de biomolécules de vastes possibilités d'utilisation dans l'industrie, particulièrement dans l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique et médicale (DELATTRE, 2005). Depuis un certain intérêt particulier est porté aux polysaccharides polyfonctionnels ayant une application dans les domaines biomédicaux. Des nombreuses études sont menées sur leurs propriétés immunomodulatrices et immunostimulantes, mais aussi sur leurs activités anti-tumorales et anti-virales, etc. Ce sont les composés polysaccharidiques d'origine végétale, animale, algale ou bactérienne qui attirent l'attention (DELATTRE, 2005).

1.1.2.1.3.1.- Polysaccharides bactériens et fongiques

Certains micro-organismes vivent et se développent sous forme agrégée. Les biofilms sont une très bonne illustration de ce type d'organisation. Ce phénomène naturel que l'on trouve à la fois chez les micro-organismes de type eucaryotes et procaryotes résulte généralement de la fixation des micro-organismes sur une matrice à l'aide de composés ou substances polymériques extracellulaires, communément appelées en anglais «Extracellular Polymeric Substances» (E.P.S). Les polysaccharides sont considérés comme leur principale composante. Leur rôle est impliqué dans l'adhésion des bactéries aux surfaces, l'agrégation des cellules, la reconnaissance cellulaire, la protection cellulaire, la rétention en eau, la fixation des composés organiques ou inorganiques (GARRIDO et *al.,* 2002).

Ces substances polymériques extracellulaires sont étudiées et sélectionnées pour leurs applications possibles dans les domaines de l'environnement, de l'industrie alimentaire, de la cosmétique, de la médicine et de la pharmacologie. Dans le domaine de l'environnement, elles sont étudiées pour leur utilisation dans la biodétoxification des milieux contaminés. De même, elles peuvent fixer et permettre l'accumulation dans des biofilms de cation tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} mais aussi des éléments comme le plomb, le zinc, le cadmium, le fer, le cobalt, le césium et le strontium qui pour certains sont des polluants toxiques (GARRIDO et *al.*, 2002).

Le xanthane produit par une bactérie phytopathogène (*Xanthomonas campestris* (BRUNETON, 1999), est largement employé dans l'industrie comme épaississant, stabilisant, émulsifiant et agent gélifiant (PSOMAS et *al.*, 2007). Le xanthane est un hétéropolysaccharide ramifié dont l'unité de répétition est un pentasaccharide constitué d'une chaîne principale cellulosique avec en alternance au C-3 de chaque résidu glucose une chaîne latérale formée d'un trisaccharide comportant des résidus α-mannose, acide glucuronique et β-mannose. Les résidus de mannose qui assure le branchement sur la chaîne principale sont généralement acétylés en C-6, et l'autre terminale est éventuellement combiné à un acide pyruvique (LIU et *al.*, 2005). Le xanthane forme des solutions aqueuses dont la viscosité est inchangée aussi bien par les variations de la température que celle de pH. Des oligoholosides de xanthane utilisés comme des éliciteurs stimulent la synthèse de phytoalexine, antimicrobien, chez les plantes (LIU et *al.*, 2005). La gomme xanthane ne gélifie pas par elle-même, mais forme des gels thermoréversibles avec d'autres gommes (KIOSSEOGLOU et *al.*, 2002).

Le Lentinane est un polymère de glucose isolé d'un champignon (*Lentinus edodes).* Structuralement, c'est un glucane à chaîne principale à liaison β-(1→3) liés, substitués par des Glc-(1→6) liés, de masse moléculaire voisine de 500 000 (Xu et *al.*, 2008). Le Lentinane présente une viscosité très élevée, permet la formation des gels à basse température. Plusieurs études illustrent des activités biologiques telles: immunostimulant de la phagocytose, sécrétion des interleukines, effet antitumoral chez les rats par activation des cellules NK (natural killer) (ZHANG et *al.*, 2005; VETVICKA et *al.*, 2007). En plus, le gellane produit par *Pseudomonas elodea*, est un nouvel agent gélifiant qui forme un gel transparent résistant à l'acide et à la chaleur en présence des cations bivalents (NISHINARI et TAKAHASHI, 2003).

Hormis des applications essentiellement exploitées dans l'industrie alimentaire,

l'extraordinaire diversité de structures des EPS en fait une classe de biomolécules dont les applications directes ou indirectes dans les domaines thérapeutiques sont en plein développement.

Le dextrane et ses dérivés sont utilisés en laboratoire comme support de la chromatographie d'exclusion sur gel (BRUNETON, 1999), mais aussi comme outil thérapeutique en tant que succédané du plasma, à cause de ses propriétés physicochimiques. Sa viscosité et son osmolarité proches de celle du plasma. Il est non toxique et serologiquement neutre (BRUNETON, 1999; BLANLOEIL et *al.*, 2002). Il est utilisé dans les indications suivantes:

- Expansion volémique dans les états de choc hémorragique et traumatique (COATS et HERON, 2004),
- Inhibition de l'agrégation érythrocytaire, en cas des thromboses (AUDIBERT et *al*., 1995),
- Formulation de collyres indiqués dans le traitement de l'insuffisance lacrymale (BRUNETON, 1999).

Les dextranes sont des homopolysaccharides synthétisés par *Streptococcus* et *Leuconostoc* (ABDEL- RAHMAN et *al.*, 2008).

Des bactéries appartenant au genre Alcaligenes sont productrices des substances polymériques extracellulaires tel que le welane, présentant des propriétés rhéologiques thermostables, permettant leurs applications dans les gisements de pétrole. Le welane est également soluble, et maintient ses propriétés rhéologiques, dans certains solvants organiques polaires, ouvrant un certain domaine d'application industrielle comme l'étalement des ailes d'avion pour empêcher l'habillage de la glace (MILES et *al.*, 1995).

1.1.2.1.3.2.- Polysaccharides d’extraits d'algues

Les parois cellulaires de l’ensemble des algues contiennent outre la cellulose et l’hémicellulose, une forte proportion de polysaccharides anioniques. Ces polyosides désignés sous le nom de phycocolloïdes, ont une composition chimique variée suivant les groupes d’algues. Ils possèdent de nombreuses propriétés et applications telles que les propriétés antitumorales et antivirales des carraghénanes, les propriétés hémostatiques et anti-gastrites des alginates, les propriétés anti-inflammatoires et anticoagulantes des fucoïdanes (DELATTRE, 2005). Les parois des algues rouges contiennent

essentiellement des galactanes sulfatés comme les carraghénanes et les agars ou les géloses. Les agars ou géloses extraits de certaines algues rouges comme *Gelidium amansii* ou *Gelidium corneum* capables de former spontanément des gels translucides thermo-réversibles. C'est principalement leur teneur en sulfate (5 % de la masse) qui les distingue des carraghénanes. Les agars sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme additif gélifiant et stabilisant. En microbilogie, ils servent à la confection de milieux solides (milieux gélosés). En biotechnologie ils servent comme support d'électrophorèse ou de filtration sur gel. Ce sont des excipients employés dans de nombreuse préparations pharmaceutiques (RANARIVELO, 2002; DELATTRE, 2005).

Parmis les polysaccharides d'extraits d'algues, l'alginate, le fucoïdane et le laminarane, ayant des propriétés gélifiantes ou épaississantes sont retrouvées dans les algues brunes. Les alginates forment le principal matériau constitutif des algues brunes. Ils peuvent représenter jusqu'à près de 40 % du poids sec de *Laminaria digitata* ou *Fucus serratus*. Ils sont principalement étudiés pour leurs propriétés gélifiantes alors que le fucoïdane et le laminarane sont étudiés pour leurs activités biologiques. Les alginates d'algues marines sont très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique (RANARIVELO, 2002; DELATTRE, 2005).

1.1.2.1.3.3.- Polysaccharides animaux

Hormis le glycogène (α-D-glucane de réserve) et la chitine (polysaccharide de structure rencontré chez les insectes, crustacés et champignons), les polysaccharides animaux appartiennent à la famille des glycosaminoglycanes (GAG) et sont issus des protéoglycanes. Ces polymères sont soit impliqués dans la structure des tissus conjonctifs (hyaluronanes, dermatanes sulfates et chondroïtines), soit dans des mécanismes de communications cellulaires via leurs propriétés fonctionnelles (héparines et héparanes sulfate). Ces polymères sont constitués de résidus neutres (glycosamine) et acides (acide glucuronique et/ou acide iduronique) plus ou moins sulfatés, unis par des liaisons glycosidiques de type α-(1→4), β-(1→4) ou β-(1→3). L'héparine est un polymère fortement lié aux protéines formant ainsi un protéoglycanes à l'état natif. Il s'agit d'une molécule à activité anticoagulante immédiate. Il est utilisé dans le traitement curatif et préventif des maladies thromboemboliques (MURRAY et *al.*, 1999).

1.1.2.1.3.4.- Polysaccharides végétaux

Les sources de polysaccharides végétaux sont multiples. Il se distingue les polysaccharides de réserve (amidon, caroube), les polysaccharides de structures (cellulose, hémicellulose, pectines), les polysaccharides exsudats (gomme arabique) et enfin les mucilages (WARRAND, 2004).

1.1.2.1.3.4.1.- Polysaccharides de réserve

- Amidon : L'amidon est la principale forme de réserve glucidique des végétaux. Il est présent dans tous les végétaux et dans toutes les parties de la plante (PARIS et HURABIELLE, 1981). Il constitue jusqu'à 70% du poids frais des graines amylacées et 30% de celui des organes de réserve, comme le tubercule de pomme de terre (GUIGNARD, 1996). C'est une source énergétique indispensable à l'alimentation (BRUNETON, 1999). Il se présente sous forme de graines arrondis ou discoïdes dispersés dans le cytosol et sans action sur la pression osmotique (GUIGNARD, 1996). A l'état natif, l'amidon existe sous la forme d'une structure lentement organisée, c'est le grain d'amidon. La fraction glucidique est un mélange de deux polymères: l'amylose et l'amylopectine. La proportion de ces deux polymères, génétiquement fixée varie de 1/8 à 1/3, non seulement suivant l'espèce, mais à l'intérieur d'une même plante, selon le tissu considéré (GUIGNARD, 1996). Les amidons sont nettement différenciés par leurs teneurs respectives en amylose: 16-17% chez le riz, 20% chez la pomme de terre, 23-24% chez l'orge, 25-28% chez le blé, jusqu'à 35% chez les pois lisses, exceptionnellement 65-70% chez les amylomais ou, au contraire, moins de 1% chez les maïs cireux. La molécule de l'amylose se présente comme une longue chaîne non ramifiée comportant 60 à 6000 monomères de glucose associés par des liaisons α-(1→4). La position en α de la liaison osidique impose une rotation entre les plans de deux monomères consécutifs. Cette rotation impose à la macromolécule une structure hélicoïdale (GUIGNARD, 1996).

L'amylopectine est beaucoup plus abondant que l'amylose; les amidons dits «cireux» ou «glutineux» en contiennent jusqu'à 95-97%, tels celles du riz, du maïs, du sorgho (LINDEN et LORIENT, 1994). L'amylopectine, est une molécule ramifiée constituée de 6000 à 600.000 unités de glucose, reste l'un des plus gros polysaccharides connus. Les chaînes latérales, constituées de huit à dix-sept monomères de glucose, sont branchés selon des liaisons α-(1→6). L'ensemble des branchements, réalisés tous les

vingt-cinq glucoses environ, se fait selon une structure en «parapluie». Les zones formées de chaînes parallèles (en fait deux hélices jumelées) correspondent aux stries denses des grains d'amidon et les zones riches en point de ramification aux couches moins denses.

La synthèse de l'amidon au niveau des organes de réserve diffère de celle réalisée par le chloroplaste. C'est un processus lent. Il s'étend sur plusieurs semaines. Les réserves accumulées ne seront utilisées qu'à la germination. La source de carbone est le saccharose provenant de feuillage. Grâce aux interconversions entre oses, il se forme du glucose-6-phosphate franchissant la membrane plastidiale interne par un translocateur de phosphate voisin de celui du chloroplaste, mais qui en diffère par sa capacité à transporter le glucose-6-phosphate (GUIGNARD, 1996).

L'amidon des grains est en effet presque insoluble dans l'eau froide (LINDEN et LORIENT, 1994). Vers 55-60°C, les grains gonflent irréversiblement, la viscosité augmente, la structure granulaire est détruite, la cristallinité disparaît: il y a gélatinisation. Il existe une température critique variable avec la structure de l'amidon: au dessus, la dispersion est irréversible; en dessous, elle est réversible. Cette température se situe entre 65 et 80°C selon le type d'amidon (LINDEN et LORIENT, 1994). Chauffées à 100°C, les molécules d'amylose diffusent dans le milieu. C'est la solubilisation, l'empesage, la formation d'un système composite de grains d'amidon gonflés «fantomes» dans une matrice de macromolecules amylosiques solubilisées. Par refroidissement, les macromolecules se réorganisent. Il se forme un gel. C'est le phénomène de rétrogradation qui s'accompagne de synérèse. Il en résulte aussi une difficulté d'hydroyse enzymatique. La rétrogradation de l'amidon a des consequences dans divers domaines: gateau non levé, crème tournée, pain durci (rassis) sans séchage, etc. La rétrogradation est d'autant plus rapide que la proportion d'amylose linéaire est plus élevée (BRUNETON, 1999).

- **Fructanes :** Les fructanes sont des polymères du fructose liés par une liaison β-(2→1) ou β-(2→6) à une molécule de glucose terminal (SIMS, 2003). RITSEMA et SMEEKENS (2003) considérent que ce sont des extenssions de saccharose. Ils sont assez fréquents chez les végétaux où ils s'accumulent surtout dans une dizaine de familles jusqu'à 15% durant la floraison. Il s'agit des inulines chez les dicotylédones, principalement les Asteraceae, les Boraginaceae et les Campanulaceae; ou des phléines et des fructanes chez les Monocotylédones, en particulier les Poaceae et les Liliaceae (VAN DEN ENDE et *al*., 2004). Ces polymères se concentrent généralement dans les organes souterrains comme les racines, les bulbes, les tubercules ou les rhizomes. Leur teneur et

leur forme varient selon la plante, le tissu, même l'état physiologique et les conditions environnementales (WACK et BLASCHEK, 2006).

Les fructanes de type inuline des Asteraceae et des Liliaceae, l'unité de base est un motif β-(2→1)-D-fructofuranosyl. Mais pour les fructanes de type phléine des Poaceae, l'unité de base est un motif β-(2→6) -D-fructofuranosyl. Cependant, chez les fructanes de type gramminane, se trouvent les deux types de liaison β-(2→1) et β-(2→6) (RITSEMA et SMEEKENS, 2003).

Les fructanes ont un rôle dans la protection des plantes contre la sécheresse, le froid et l'hypersalinité par la protection des lipides membranaires au cours de la phase de transition exprimée par les cellules au moment de stress (RITSEMA et SMEEKENS, 2003).

La racine de chicorée est particulièrement riche en inuline (50-60% de la drogue sèche). Elle s'utilise traditionnellement par voie orale comme cholérétique; pour faciliter les fonctions d'élimination urinaire et digestive; pour favoriser l'élimination rénale de l'eau; comme adjuvant des régimes amaigrissants; dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que les ballonnements épigastriques, la lenteur de digestion, la flatulence (BRUNETON, 1999).

La racine de pissenlit est riche en potassium, en fructose et en inuline. La teneur en fructose est maximale au printemps alors que celle de l'inuline atteint 40% en automne. Elle a presque les mêmes données pharmaceutiques que celle de la chicorée (BRUNETON, 1999).

- Caroube: L'albumen des graines du Caroubier ou *Ceratonia siliqua* L. de la famille Caesalpiniaceae, constitue la caroube ou farine de graine de caroube. La caroube est constituée d'un D-galacto-D-mannane presque pur (90-95 %). Ce polymère est formé par l'enchaînement de β-D-mannoses liés en 1→4, avec des branchements latéraux d'une seule unité d'α-D-galactose liée α-(l→6). Partiellement soluble dans l'eau froide, la caroube se solubilise à chaud aux environ 80°C. Elle donne à froid des solutions pseudo-plastiques de grande viscosité supportant bien des variations importantes de pH pouvant aller de 3 jusqu'à 11, et l'adjonction de sels minéraux. Les solutions de la caroube forment des gels en présence de borate de sodium en milieu alcalin (BRUNETON, 1999). La farine de caroube associée à l'aleurone de tournesol et de riz constitue une préparation

absorbante proposée dans le traitement symptomatique des diarrhées du nourrisson et de l'enfant. Diluée dans de l'eau ou dans du lait, la caroube s'utilise lors des vomissements habituels du nourrisson (BRUNETON, 1999). Dénuée de pouvoir nutritif, la caroube épaissit les rations sans modifier l'apport calorique. Elle s'utilise comme adjuvant des régimes amaigrissants (BRUNETON, 1999). De même dans l'industrie, l'adhésivité et le pouvoir épaississant des solutions de gomme du caroube font qu'elle est utilisée dans la formulation de produits lactés frais ou congelés comme les crèmes, les glaces, etc…, mais aussi dans des produits de boulangerie car comme le guar, elle gonfle la pâte (BRUNETON, 1999).

- Guar: Le guar provient du simple broyage de l'albumen des graines de *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) de la famille des Fabaceae. Il s'utilise en industries pharmaceutiques et agroalimentaires (BRUNETON, 1999). C'est un D-galacto-D-mannane formé par l'enchaînement de β-D-mannoses liés en 1→4 avec des branchements latéraux comportant une seule unité d'α-D-galactose liée (1→6) (BRUNETON, 1999; CUNHA et *al.,* 2007). Au niveau du métabolisme glucidique, l'addition de guar à la ration alimentaire diminue l'hyperglycémie et l'insulinémie post-prandiale par un effet physique en blocant l'α amylase (BRENNAN et *al.*, 1996). Concernant le métabolisme lipidique, la prise quotidienne de guar diminue la cholestérolémie et la lipoprotéine type LDL (low density lipoproteins) sans affecter les autres lipoprotéines et sans abaisser la triglycéridémie (BRUNETON, 1999; CUNHA et *al.*, 2007). Le guar associée à un régime hypolipidique et riche en sucre peut aider à remédier transitoirement à une hypercholestérolémie modérée. Elle s'utilise en association avec la montmorillonite comme pansement intestinal, dans le traitement symptomatique des colopathies avec constipation (BRUNETON, 1999; CUNHA et *al.,* 2007). La viscosité des solutions de la gomme de guar augmente en leur additionnant de la gomme xanthane. Toutefois, la gomme guar est un émulsionnant et un gélifiant selon les conditions. Elle est utilisée comme transporteur de médicaments de transit intestinal, comme les anti-cancers colerectal (CUNHA et *al.*, 2007).

- Konjak: *Amorphophallus konjac* K. Koch (Aracceae), est originaire de l'Asie. Il se cultive, notamment au Japon. Le tubercule d'*A. konjac* accumule un glucomannane, à liaisons β (1→4). Le rapport de D-glucose /D-mannose est égal à 1/ 1,6. La chaîne principale est partiellement substituée, surtout sur les hydroxyles en C-3, par du D-mannose ou du D-glucose. Le degré de polymérisation du polymère semble varier selon l'origine géographique (KATSURAYA et *al.,* 2003). Le glucomannane possède 5 à 10%

de résidu substitut d'acétyle, ce qui confère au polysaccharide une solubilité dans les solutions aqueuses. La désacétylation par les alkali transforme le glucomannane à un gel thermostable (NISHINARI et TAKAHASHI, 2003). Traditionnellement les tubercules de konjak sont coupés, séchés et pulvérisés. La farine obtenue peut être incorporée dans des préparations alimentaires comme les pains. Les glucomannanes réduisent significativement la cholestérolémie et le LDL-cholestérol (BRUNETON, 1999).

- Fenugrec: *Trigonella foenum graccum* L. (Fabaceae) ou le fenugrec est une herbe annuelle. Elle est cultivée sur le pourtour méditerranéen. Les graines du fénugrec sont riches en glucides; fibres (la cellulose, l'hémicelluloses) et galactomannane soluble (SHIRANI et GANESHARANEE, 2008). Les graines de cette Fabaceae sont connues pour leurs propriétés antidiabétiques, hypocholestérolémiantes et hypolipidémiantes. Elles diminuent la glycémie post-prandiale chez le rat et le chien diabétiques. Des effets analogues sont notés chez 1'homme normal ou diabétique. Le fractionnement des constituants des graines et l'évaluation biologique des fractions montrent que l'activité antidiabétique et hypocholestérolémiante sont liées à la fraction riche en fibres et en galactomannanes. En phytomédicaments, les graines de fenugrec s'utilisent pour faciliter la prise de poids et contre les inflammations locales (SHIRANI et GANESHARANEE, 2008).

- Févier: Les longues gousses arquées du févier ou *Gleditsia triacanthos* L., (Caesalpiniaceae) sont recherchées à des fins ornementales. Elles fournissent des graines riches en galactomannane. Les emplois de la poudre de l'albumen sont, à l'heure actuelle, très restreinte. La graine a un effet de lest (BRUNETON, 1999).

- Tara: Le broyage de l'endosperme des graines de tara ou *Caesaipinia spinosa* Kuntze (Caesalpiniaceae) donne un galactomannane soluble**.** La force et l'élasticité de ses gels peuvent être augmentées par addition de gomme xanthane (BRUNETON, 1999).

1.1.2.1.3.4.2.- Polysaccharides de structures

- **Cellulose**: La cellulose est le principal constituant de la paroi cellulaire des végétaux (PARIS et HURABIELLE, 1981). Elle existe à l'état majoritaire dans de nombreuses plantes à fibres textiles comme le lin, le chanvre, le jute, la ramie. Elle est presque pure, dans les poils recouvrant les graines de coton (*Gossypium* spp, Malvaceae) (PARIS et HURABIELLE, 1981). La macromolécule de cellulose est constituée de monomères de

glucose reliés en β-(1→4). Elle forme une longue chaîne tendue. Le motif répétitif est constitué par deux monomères de glucose, l'un droit, l'autre renversé. En raison de la structure orientée du polymère, les deux extrémités de la chaîne sont différentes et seule l'une d'elles présente un OH hémi acétalique à propriété réductrice. Le degré de polymérisation varie de 300 à 15000 (soit une masse moléculaire de 5×10^4 à 2.5×10^6) selon l'origine botanique, l'âge du tissu, le procédé de l'obtention. Dans les parois secondaires des végétaux supérieurs, le degré de polymérisation est de 6 à 10000; dans les capsules de coton non ouvertes, il atteindrait 15000 (BRUNETON, 1999). Les chaînes sont associées en paquets de microfibrilles formant un réseau visible au microscope électronique. Dans ces microfibrilles, les molécules sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes. La liaison osidique est faible, mais répétée un grand nombre de fois assurent une grande cohésion, conduisant dans certaines régions à un arrangement cristallin. Ce dernier est responsable de la biréfringence de la cellulose en lumière polarisée et de sa propriété de diffracter les rayons X. La taille et la forme des microfibrilles, lesquelles regroupent un nombre variable de chaînes (500 à 2000), dépendent des cellules, de l'âge des espèces. Leurs sections peuvent être plus faibles, de 0.1 nm chez les microfibrilles très fines jusqu'à exceptionnellement 30 nm chez l'algue *Valonia* sp où l'on trouve une cellulose à grande cohésion, constituant une référence pour les études cristallographiques. La cellulose apparaît ainsi largement polymorphe (GUIGNARD, 1996).

Les liaisons hydrogènes intramoléculaires (entre l'oxygène du cycle pyranne et l'hydroxyle du carbone 3) stabilisent la forme en ruban tendu (dite également caténaire) de la chaîne. Les liaisons hydrogènes interchaînes (entre l'oxygène du pont osidique et l'hydroxyle du carbone 6 assurent la cohésion à l'intérieur des microfibrilles (GUIGNARD, 1996). La structure fibrillaire très condensée explique la résistance aux attaques chimiques (la cellulose est insoluble dans tous les solvants exceptée la liqueur ammoniacale de Schweitzer) et enzymatiques (réalisées seulement par quelques cellulases bactériennes). Elle explique également la résistance mécanique à la traction, d'où l'emploi des fibres végétales comme textile, cordage. La résistance d'un fil de cellulose est identique à celle d'un fil de cuivre de même diamètre (GUIGNARD, 1996).

Les espaces entre les microfibrilles sont de l'ordre de 1 à 10 nm. Il en résulte une structure capillaire permettant la circulation de l'eau et des sels minéraux. Les hémicelluloses, les lignines se logeront dans ces espaces microfibrillaires lors de la constitution de la paroi définitive. La richesse en groupements hydroxyles explique que malgré son insolubilité dans l'eau, la cellulose reste très hygrophile (propriété absorbante

des vêtements en coton) (GUIGNARD, 1996).

Le coton a de nombreux emplois en médicine et en chirurgie comme isolant et absorbant. Du coton hydrophile supérieur ou coton cardé blanchi et débarrassé des matières résineuses qui entourent ses fibres, est préparé les gazes et l'ouate de cellulose chirurgicale (stérilisation) (PARIS et HURABIELLE, 1981).

Toutefois, la cellulose, polymère ployhydrxylé peut être facilement estérifiée et éthérifiée. L'estérification conduit à des produits (nitrate, acétate de cellulose) aux usages multiples : fabrication de plastifiants, de films, de filtres, de membranes de dialyse; l'acétophtalate forme des films gastrorésistants. Le phthalate d'hydorxypropyl-méthylcellulose s'utilise également pour la micro-encapsulation et pour l'obtention de microgranules à libération prolongée. Mais l'éthérification conduit à des polymères hydrosolubles aux applications technologiques nombreuses: méthyl-, éthyl-, propyl-et carboxyméthylcellulose. Pour tous les dérivés de la cellulose, l'hydrosolubilité dépend du degré de substitution des hydroxyles du polymère natif. La plupart se dissolvent dans l'eau en formant des solutions très visqueuses. C'est ce qui justifie leur large utilisation dans le domaine de la pharmacotechnie et de la cosmétique comme filmogènes, épaississants, lubrifiants (comprimés, gels, crèmes, lotions, dentifrices) (LINDEN et LORIENT, 1994).

- Pectines: Les pectines sont des macromolécules de nature glucidique, d'origine exclusivement végétale. Ce sont les principaux constituants de la lamelle moyenne des parois cellulaires. Elles sont essentiellement composées d'acides galacturoniques. Les pectines forment un véritable ciment biologique qui rattache les cellules les unes aux autres (PRAT et *al*., 2002). Elles se retrouvent également des pectines dans la matrice des parois primaires et en plus faible quantité dans les parois secondaires des cellules. Les pectines sont abondantes dans les fruits tels que la pomme et le citron où leur nature évolue avec l'âge des tissus. D'abord insolubles, elles assurent la rigidité des tissus; elles sont ensuite dégradées en sucres et en acides par voie enzymatique au cours de la maturation des fruits; la dégradation des pectines est l'un des mécanismes qui conduit au ramollissement des tissus (DELATTRE, 2005). La chaîne principale des pectines est constituée d'acide galacturonique. Elle constitue un acide polygalacturonique. Certains monomères peuvent être méthylés. Selon la proportion de monomères méthylés ou non, la chaîne est plus ou moins acide. Cette chaîne n'est ni monotone et ni linéaire (PRAT et *al.*, 2002). Des rhamnoses cassent la linéarité et des chaînes latérales constituées de

divers oses rendant la molécule très complexe. Les pectines peuvent se subdiviser en substances pectiques acides (homogalacturonane, rhamnogalacturonane) en substances pectiques neutres (arabinanes, galactanes, arabinogalactanes) associées de manière covalente au sein de la macromolécule pectique (DELATTRE, 2005).

Les homogalacturonanes (HGAs) nommés zones lisses, sont des chaînes linéaires polygalacturoniques composées de 100 à 200 résidus d'acide galacturonique liés en α-(1→4). Ils dépendent étroitement de la nature de la plante et peuvent être partiellement O-méthylés et/ou O-acétylés en position C-2 et/ou C-3 (DELATTRE, 2005).

Les RGs de type I (RG-I) nommés zones hérissées, sont composés d'un squelette basé sur une dizaine de répétition d'une unité disaccharidique mettant en jeu l'unité α-L-rhamnose et l'unité acide α-D-Galacturonique. On notera que 20 à 80% des résidus L-Rha, sont selon l'origine végétale et la méthode d'extraction, substitués au niveau du C-4 par des chaînes latérales d'oses neutres telles que des galactanes, des arabinanes, des arabinogalactanes ou plus rarement des xylanes et des fucanes (WARRAND, 2004). Les RGs de type II (RG-II) sont une famille de composés pectiques plus complexes et moins fréquents qui différent des RGs-I par leur enchaînement linéaire d'homogalacturonane. De plus, les substitutions rencontrées en C-3 sont différentes de celles des RGs-I. Il peut y avoir des substituants de type: 2-O-methyl-L-Fucose, D-apiose, dihydroxy-D-apiose (DHA) 2-O-methyl-D-Xylose, ou encore l'acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonique (KDO). Les RG-II sont principalement présents dans les divers jus de fruits (WARRAND, 2004).

L'intérêt des pectines en pharmacie est lié à leur hydrosolubilité. Elles constituent une préparation épaississante du contenu gastrique, un régulateur du transit; assez rapidement fermenté, elles favorisent la croissance bactérienne, augmentant ainsi le volume fécal. Elles sont utilisées dans le traitement symptomatique des régurgitations du nourrisson dans des diarrhées. En diététique, l'utilisation régulière des pectines a démontré son efficacité dans le contrôle de la cholestérolémie et la prévention des maladies cardiovasculaires. Elles sont surtout employées en industrie agroalimentaire comme agent stabilisant et gélifiant des confitures, des gelées, des desserts glacés, des sauces, etc. (BRUNETON, 1999).

- Xylanes: Ils représentent les seconds biopolymères les plus abondants dans le règne végétal (KAMERLING et *al*., 2007). Ils se retrouvent chez des angiospermes

monocotylédones ou dicotylédones, mais aussi dans quelques familles d'algues rouges et vertes. Les xylanes représentent, la proportion majoritaire des hémicelluloses dans les parois cellulaires des plantes. Ils se situent principalement dans les parois secondaires (KAMERLING et *al*., 2007). Leur concentration varie de 15 à 40% de la matière sèche en fonction de la nature de la céréale. Parmi, les sources potentielles de ces hémicelluloses, se retrouvent les cannes à sucres, le sorgho, le blé et les pommes de terre. Ils sont composés par une chaîne linéaire de résidus xylopyranoses liés en β-(1→4). Cette chaîne de xylose peut être substituée par un certain nombre de chaînes latérales (KAMERLING et *al*., 2007). Selon la nature des substituants, on peut distinguer:

- Les arabinoxylanes, substitution par des unités d'arabinose en position C-2 et/ou C-3 du résidu xylose.

- Les glucuronoxylanes, substitution par des unités d'acide glucuronique ou son dérivé C-4 méthylé, lié en position C-2 du résidu xylose.

- Les glucuronoarabinoxylanes, substitution à la fois par des unités d'acide glucuronique et par l'arabinose.

- Les monosaccharides issus de la dégradation des xylanes sont utiles dans la production de différents antibiotiques, alcools, nourriture d'animaux et produits chimiques. Par ailleurs, la dégradation enzymatique des xylanes fournit de grande quantité de résidus de xylose qui sont modifiés pour donner du xylitol, incorporé dans les sucreries diététiques.

1.1.2.1.3.4.3.- Exsudats et mucilages

Les exsudats ou les gommes et les mucilages sont des classes de polysaccharides végétaux très proches et difficilement dissociables. Il est difficile de résoudre le problème de savoir si un exsudat de plante ou un extrait doit être nommé gomme (collante) ou mucilage (visqueux, gluant). Les exsudats provenant des surfaces d'arbres forment un groupe reconnaissable appelé gommes (gommes d'acacia, tragacanthe, karaya, ghatti,...). Le mucilage tend à s'appliquer aux extraits provenant de graines ou aux substances qui coulent d'écorce ou de tissus souples (feuilles, tiges, racine) comme dans le cas des espèces du Psyllium (Plantago).

1.1.2.1.3.4.3.1.- Exsudats

- Gomme de sterculia: La gomme de sterculia (*Sterculia* sp., Sterculiaceae) est l'exsudat visqueux naturel ou provoqué par incision du tronc et des branches de certaines espèces

du genre Sterculia comme *Sterculia foetida, Sterculia urens* (MARVELYS et *al.,* 2006). La gomme native se présente en morceaux irréguliers, translucides (PARIS et HURABIELLE, 1981), blanc rosé à brunâtres et d'odeur acétique (MARVELYS et *al.,* 2006). Leur poids moléculaire est important soit aux environs de $2–5\times10^6$. Elle est très peu soluble dans l'eau. Toutefois, les particules des gommes, sont qu'elles absorbent l'eau et gonflent dans des proportions considérables en formant une suspension de haute viscosité. La viscosité dépend du degré d'acétylation. En désacétylant la gomme forme une pâte élastique fortement adhésive (MARVELYS et *al.,* 2005). L'exsudat est un polysaccharide de type rhamnogalacturonane dont l'unité de base est formée d'acide α-D-galacturonique lié par l'hydroxyle en C-4 en alternance avec un résidu α-L-rhamnose lié par l'hydroxyle en C-2. Leurs proportions dépendent du type et de l'origine de la gomme (LE CERF et *al.,* 1990). Initialement considérée comme un succédané de la gomme adragante, la gomme de Sterculia a de nombreux avantages pharmaceutiques. Sa capacité à former des dispersions visqueuses en gonflant fortement en fait un laxatif. Elle est infermentescible, non absorbée, non dégradée, non toxique (WU et *al.,* 2007). Elle est indiquée dans le traitement symptomatique de la constipation. La gomme de Sterculia est également employée comme substance de lest acalorique apportant une sensation de satiété et s'utilise comme adjuvant des régimes amaigrissants. Son pouvoir adhésif justifie son utilisation pour la fixation des prothèses dentaires (BRUNETON, 1999).

- Gomme arabique: La gomme arabique est l'exsudation gommeuse, durcie à l'air, s'écoulant naturellement ou par incision du tronc et des branches d'*Acacia senegal* et d'autres espèces du genre Acacia (PARIS et HURABIELLE, 1981). La gomme se présente en masses sphéroïdales de 1 à 3 cm de diamètre, friables, blanc jaunâtre ou faiblement ambrées, opaques, souvent brisées en fragments irréguliers. La gomme est inodore, insipide adhérente à la langue. Pulvérisée, c'est une poudre blanche plus ou moins jaunâtre qui se dissout très lentement dans 2 fois sa masse d'eau en formant une solution visqueuse dense, adhésive. Faiblement acide, active sur la lumière polarisée (lévogyre) (BRUNETON, 1999). La gomme brute contient 10-15% d'eau, un peu de tanins surtout dans les drogues colorées. Il n'y a pas d'amidon. Le composant majoritaire est un polysaccharide acide qui existe à l'état natif sous forme de sel avec le calcium et, dans une moindre mesure, le magnésium et le potassium (AL-ASSAF et *al.,* 2007). Le polymère varie selon l'arbre, son origine géographique, l'époque de la récolte. Sa masse moléculaire se situe entre 2.5×10^5 à 10^6 (MOTLAGH et *al.,* 2005). Son analyse révèle la présence de plusieurs sucres dont le D-galactose (32-50 %), le L-arabinose (17-34 %), l'acide D-glucuronique (13-19 %), le L-rhamnose (11-16 %) et 2% de protéines riche en

résidu hydroxyprolyl et seryl, ainsi, des lipides**,** souvent de la ceramide lié au glycosyl phosphatidyl inositol (YADAV et *al.,* 2007). La structure de base est celle d'un galactane l→3 substitué par des arabinoses isolés ou en courtes chaînes et par des oligosides complexes comprenant du D-galactose du L-arabinose, du L-rhamnose et de l'acide D-glucuronique (AL-ASSAF et *al*., 2007).

Les hiéroglyphes égyptiens attestent l'usage ancien de cette gomme (YADAV et *al.,* 2007). La gomme arabique, émolliente et béchique, entre dans la composition de préparations classiques telles que les pâtes officinales. Son absorption quotidienne est sans effet sur la cholestérolémie. Elle est très soluble dans l'eau et forme des solutions visqueuses dont le comportement, d'abord la viscosité est indépendante de la contrainte de cisaillement, devient pseudoplastique pour les fortes concentrations. La viscosité des solutions dépend de l'origine de la drogue (espèce, saison de récolte) et, est très influencée par le pH (elle est maximale au voisinage de la neutralité), la température et la présence d'électrolytes la diminuent (BRUNETON, 1999). La gomme est largement répandue en raison de son émulsification excellente avec une moindre viscosité. Elle est utilisée en industrie agroalimentaire. C'est un stabilisant et un émulsionnant totalement atoxique**.** Elle est également utilisée dans les céramiques de haute technologie, les encres lithographiques, des revêtements de papier, les inhibiteurs de corrosion des métaux, les colles bureautiques, les pesticides, comme agent de floculation utilisé dans le raffinage de minerai (MOTLAGH et *al.,* 2006).

- Gomme adragante: La gomme adragante est une exsudation gommeuse d'*Astragalus gummifer* (Fabaceae), s'écoulant naturellement par incision du tronc et des branches. Elle provient aussi de certaines espèces d'Asie occidentale (MOHAMMADIFAR et *al.*, 2006). La gomme adragante ou tragacanh gum des Anglo-Saxons est inodore et insipide. Les membranes cellulaires stratifiées qui enveloppent les grains d'amidon se colorent en violet par addition d'une solution de chlorure de zinc iodée (MOHAMMADIFAR et *al.,* 2006). Contrairement à la gomme arabique, la gomme adragante renferme environ 3% d'amidon et 3-4% de substances minérales. La gomme brute est un mélange de deux polysaccharides:

. La tragacanthine (30-40%) est neutre et soluble dans les solutions hydro-alcooliques. Elle se solubilise dans l'eau en formant une solution colloïdale.

. La bassorine (60-70 %) est acide et précipite en milieu éthanolique. Elle gonfle au contact de l'eau pour former un gel.

La tragacanthine est un arabinogalactane presque neutre dont l'ossature est galactosidique. La bassorine ou l'acide tragacanthique est un glycanogalacturonane partiellement méthylé de masse moléculaire voisine de 850.000, construit à partir de quatre sucres: acide D-galacturonique, D-galactose, D-xylose et L-fucose. La chaîne est substituée par des xyloses ou par des diosides: fucoxylosyles ou galactoxylosyles (MOHAMMADIFAR et *al.,* 2006).Très ancienne drogue connue et recherchée par les médecins grecs, la gomme adragante est indiquée comme traitement symptomatique de la constipation. Elle est surtout utilisée comme auxiliaire de fabrication en pharmacotechnie. Ses solutions diluées de 0,5 à 1% sont très visqueuses, stables en milieu acide et à la chaleur. Elles sont compatibles avec la plupart des hydrocolloïdes végétaux. Elles se conservent. Elles ont un comportement pseudoplastique ce qui ajouté au caractère anionique, en fait un bon stabilisant des suspensions. La gomme adragante peut aussi être utilisée pour former et stabiliser des émulsions: émulsionnant bifonctionnel. Elle augmente la viscosité de la phase aqueuse et diminue la tension interfaciale dans les émulsions huile/eau (BRUNETON, 1999).

- Gomme ghatti: La gomme ghatti est l'exsudat visqueux d'un arbre des forêts de l'Inde et du Sri Lanka, *Anogeissus latifolia* (Combretaceae). C'est un polysaccharide complexe contenant du D-mannose, du D-galactose, du L-arabinose, du D-xylose et de l'acide D-glucuronique. Elle se disperse dans l'eau en formant des solutions très visqueuses. Émulsionnant et stabilisant, elle tend à être remplacée par d'autres polysaccharides comme le guar ou des dérivés de la cellulose, à cause de sa forte viscosité (BRUNETON, 1999).

1.1.2.1.3.4.3.2.- Mucilages

- Mucilages des Plantaginaceae: Plusieurs espèces du genre Plantago de la famille des Plantaginaceae fournissent des drogues utilisées en pharmacie comme les graines d'ispaghul (*Plantago ovata*) et de psyllium (*Plantago afra*) qui sont des polysaccharides très hydrophiles à propriétés laxatives. Les feuilles de *P. asiatica* L. s'utilisent en pharmacopée chinoise comme des expectorantes, des diurétiques et des antimicrobiennes (SINGH, 2007).

Ispaghul et psyllium: Le tégument de la graine et la graine d'ispaghul, et la graine de psyllium sont des laxatifs ayant un effet de lest. Leurs effets est mécanique et lié à leur mucilage. Les macromolécules polysaccharidiques peu fermentescibles, absorbent un grand volume d'eau et forment, au niveau du côlon, un gel volumineux qui augmente la

masse, le degré d'humidité et l'acidité du bol fécal, stimule le péristaltisme et facilite l'exonération sans pour autant modifier sensiblement la durée du transit. Le mucilage n'est pas dépolymérisé au niveau de l'intestin grêle et n'est que très partiellement dégradé par les bactéries du côlon (SINGH, 2007). Ces mucilages diminuent l'hyperglycémie post-prandiale. Il semble que l'augmentation de la viscosité dans l'intestin grêle freine la résorption du sucre et l'activité hypocholestérolémiante est semblable à celle qui est consécutive à la prise de galactomannanes ou de pectines. Le mucilage alimente l'élimination fécale des acides biliaires et du cholestérol et en se liant à ceux-ci. Il diminue leur réabsorption intestinale. La consommation quotidienne de psyllium aux environ de 10 g/j de préférence mélangé à des aliments, entraîne une modeste diminution du cholestérol entre 4 et 8% et du lipoprotéine type Low Density Lipoprotein, se situant entre 8 et 13%. Mais est sans effet sur la triglycéridémie et la lipoprotéine type High Density Lipoprotein. Les polysaccharides de psyllium et d'ispaghul sont de type hétéroxylanique contiennent 10% d'arbinose et 70% de xylose; ainsi que de l'α-D-galacturonyl-(1→4)- L- xylose et du D-galactose (FISHER et *al.*, 2004).

Grand plantain (*Plantago major* L.): SAMUELSEN et *al.*, (1998) ont caractérisés deux types de polysaccharides bioactives à partir feuille de *P. major*. L'un est de type pectique. Le second est un arabinogalactane de poids moléculaire 77-80 kDa. Il contient 38% d'arabinose, 49% de galactose, 6% de rhamnose, 7% d'acide galacturonique et 1.5% de protéine. Ce polysaccharide influe sur le système immunitaire, comme anti–complément.

Plantain lancéolé (*Plantago lanceolata* L.): A partir des feuilles de *P. lanceolata*, EBRINGEROVA et *al.* (2003) ont isolé un polysaccharide de type rhamnoarabinogalactane. Il contient une quantité significative de protéines. Elle est traditionnellement utilisée comme traitement d'appoint adoucissant et antiprurigineux des affections dermatologiques, comme trophique protecteur dans le traitement des crevasses, des écorchures, des gerçures et contre les piqûres d'insectes ainsi qu'en cas d'irritation ou de gêne oculaire due à des causes diverses comme (atmosphère enfumée, effort visuel soutenu et bains de mer ou de piscine). Le plantain lancéolé peut être utilisé par voie orale en cas d'encombrement des voies respiratoires, pour traiter les inflammations de la bouche et de la gorge. Il est aussi utilisé localement, en cas d'inflammation (BRUNETON, 1999).

- Mucilages des Malvales: Les espèces végétales réparties dans les différentes familles qui constituent l'ordre des Malvales renferment très souvent des cellules ou des canaux mucilagineux. La pharmacie et la phytothérapie utilisent très couramment des Malvaceae comme la mauve (*Malva sylvestris* L.) et la guimauve (*Althœa officinalis* L.); des

Tiliaceae comme (tilleuls) (BRUNETON, 1999).

Guimauve et mauve: La guimauve est une grande herbe vivace de 0,6-1,2 m, spontanée dans toute l'Europe. L'examen microscopique révèle que les parenchymes des racines, feuilles et fleurs renferment des cellules qui se colorent rapidement en présence de rouge de ruthénium. Globalement, les polysaccharides des Malvaceae présentent une chaîne rhamnogalacturonique et des ramifications par des acides uroniques et du galactose (TOMODA et *al.*, 1989). Les feuilles et les fleurs de *Malva sylvestris*, de même que les feuilles, les fleurs et les racines d'*Althœa officinalis* s'utilisent par voie orale comme traitement des troubles fonctionnels digestifs et dans le traitement symptomatique de la toux. Ainsi par usage local, comme traitement d'appoint adoucissant et antiprurigineux des affections dermatologiques, comme trophique protecteur dans le traitement des crevasses, écorchures, gerçures et contre les piqûres d'insectes et comme antalgique dans les affections de la cavité buccale et/ou du pharynx (BRUNETON, 1999).

Tilleul (*Tilia cordata*, Tiliaceae): Les inflorescences de tilleul renferment un mucilage constitué de cinq fractions où prédominent D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose et acides uroniques. Par voie locale, les préparations de tilleul s'utilisent en traitement d'appoint adoucissant et antiprurigineux des affections dermatologiques, comme trophique protecteur dans le traitement des crevasses, écorchures, gerçures et contre les piqûres d'insectes (BRUNETON, 1999).

- Lin (*Linum usitatissimum* L., Linaceae): Le mucilage représente 10% de la composition totale de la graine. Il peut être fractionné en une fraction neutre qui est un arabinoxylane ramifié composé de D-xylose, de L-arabinose, de D-glucose et de D-galactose et une fraction acide principalement composée de L-rhamnose et de de D-galactose. La présence d'un mucilage justifie l'emploi de la graine de lin comme laxatif à effet de lest. Le mucilage a la capacité d'augmenter le volume du contenu intestinal et donc de stimuler le péristaltisme, ainsi que celle de protéger la muqueuse en cas d'inflammations (colites) (BRUNETON, 1999).

- Cognassier (*Cydonia vulgaris* L., Rosaceae): Les graines de cet arbre cultivé, fournissent un mucilage employé dans la formulation de produits cosmétiques (BRUNETON, 1999).

- Aloès du Cap (*Aloe ferox)* et Aloès des Barbades (*Aloe vera* L., Liliaceae): Les aloès (plus de 150 espèces), sont des plantes à port plus ou moins arborescent, à feuilles épaisses et charnues. La section transversale de la feuille montre, sous un épiderme à

cuticule très épaisse, un parenchyme chlorophyllien et une région centrale à mucilage. Le gel est obtenu après élimination des tissus les plus externes de la feuille (BRUNETON, 1999). FEMENIA et *al.*, (1999) note chez *Aloe vera* une prédominance des polymères du mannose (acemannane), de la cellulose et des pectines. Le gel d'aloès représente des propriétés cicatrisantes. Cette activité est due aux polysaccharides immunostimulants. La grande richesse en eau conférant au gel des propriétés hydratantes, isolantes et protectrices. Le gel est très utilisé dans les produits cosmétiques comme composant hydratant de préparations liquides ou pâteuses: produits de rasage, pommades cicatrisantes, masques, crèmes. Il entre dans la composition de phytomédicaments traditionnellement utilisés comme traitement d'appoint, d'adoucissant et d'antiprurigineux des affections dermatologiques, contre les piqûres d'insectes, en cas d'érythème solaire, etc. (BRUNETON, 1999).

1.1.2.2.- Hétérosides

L'hétéroside résulte de l'établissement d'une liaison osidique entre un ose ou oligoside et une molécule non osidique, la génine ou aglycone. Si la liaison implique un groupe azoté de la génine, on parle de N-hétéroside comme les nucléosides. Si cette liaison implique un hydroxyle alcoolique ou phénolique de la génine, on parle de O-hétéroside comme le cas de la majorité des innombrables hétérosides spécifiques du règne végétal (saponosides, flavonoides, glycoalcaloides, etc.). Les C-hétérosides dans lesquels la liaison ose- génine se fait directement entre deux atomes de carbone. Signalons enfin que les S-hétérosides, connus sous le nom glucosinolates, sont caractéristiques de certaines espèces végétales, en particulier chez les Brassicaceae et les Capparidaceae (BRUNETON, 1999).

Chapitre II.
Méthodologie de travail

2.1.- Présentation de la zone d'étude

La région de Ghardaïa s'étend sur une superficie de 86.105 km^2. Elle se situe au centre du Sahara Septentrional. Le chef lieu de la wilaya représenté par la localité de Ghardaïa, est à 600 km d'Alger. Elle s'étend entre 3° 49' de longitude Est et 32° 23' de latitude Nord sur une altitude d'environ 450 m (D.P.A.T, 2007). Le climat de la zone est caractérisé notamment par la faiblesse et l'irrégularité des précipitations, avec un cumul annuel de 89 mm estimé sur 10 ans. Les températures moyennes annuelles sont élevées, avec un maximum de 34,59 °C au mois de juillet et un minimum de 11,23 °C au mois de Janvier. La durée d'insolation maximum est de 112,3 heures au mois de juin et un minimum de 77,5 heures au mois de décembre. La vitesse moyenne du vent, est estimée à 3,06 m/s au mois d'octobre, tandis qu'elle atteint 4,44 m/s au mois d'avril. L'humidité relative est maximale au mois de décembre avec 58,37% et minimale au mois de juillet avec 23,27% (O.N.M., 2005). Le sol de la Chebka est constitué par des calcaires dolomitiques (LE LUBRE, 1952).

2.2.- Principe d'étude

L'intérêt porté aux plantes spontanées médicinales comme sources naturelles de nombreux principes actifs, a sensiblement augmenté au cours des 20 dernières années. De plus, une attention particulière est donnée aux polysaccharides. Ce sont composants de différentes drogues traditionnelles européennes et asiatiques (EBRINGEROVA et *al*. 2003). Le présent travail s'oriente sur l'étude des polysaccharides potentiellement actifs dans quelques plantes spontanées médicinales de la région de Ghardaïa. L'objectif recherché, est une contribution à élargir le spectre des composés biologiques actifs, pouvant devenir des substituts de drogues synthétique. L'étude porte sur l'extraction des polysaccharides et l'étude de leur composition globale, par des méthodes colorimétriques de quelques plantes spontanées endémiques à caractère médicinal du Sahara septentrional Est Algérien. Il sera déterminé les teneurs en oses neutres, en acides uroniques et en protéines. De même des analyses qualitative et quantitative des résidus glycosidiques par chromatographie sur couche mince et par chromatographie échangeuse d'anions haute performance seront effectuées. Parallèlement, une contribution à l'étude de l'activité biologique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides sera effectuée chez *Klebsiella pneumonea pneumonea*.

2.3.- Matériel d'étude

2.3.1.- Choix des plantes

Les plantes spontanées à caractère médicinal sont choisies en fonction de critère botanique. Ainsi, il est passé au crible des familles botaniques, comportant dans leurs tissus et spécialement au niveau des feuilles des cellules à mucilage. Les familles retenues se retrouvent parmi les Malvaceae, les Polygonaceae, les Rhamnaceae, les Plantaginaceae et les Liliaceae (MATTHEWS et ENDRESS, 2006). Les caractéristiques des différentes espèces choisies selon les familles botaniques ciblées, sont consignées dans le tableau 1. Ce sont des espèces spontanées vivace ou éphémère, réparties dans la région de Ghardaïa. Il s'agit de *Malva parviflora* (Malvaceae), *Asphodelus tenuifolius* (Liliaceae), *Rumex vesicarius* (Polygonaceae), *Zizyphus lotus* (Rhamnaceae) et *Plantago notata* (Plantaginaceae).

- *Malva parviflora* (**Malvaceae):** *Malva parviflora* est une espèce herbacée à tiges diffuses ou dressées. Les feuilles sont pétiolées et alternes, à limbe circulaire peu profondément dentée. Les fleurs sont à corolle très petite d'un blanc-bleuâtre. Le fruit est composé d'akènes, réunis en un anneau (OZENDA, 1983) (Fig. 1). En cas de fièvre et de constipation, les feuilles et les fruits sont utilisés en décoction. En dermatose, les fleurs sont employées pour faire des compresses émollientes (BATTANDIER, 1882).

- *Asphodelus tenuifolius* (Liliaceae): Cette plante annuelle de 10 à 30 cm, est non visqueuse. Les feuilles sont cylindriques, creuses, de couleur vert vif, prenant naissance à la base, avec les hampes courtes. Les fleurs sont blanches à pédoncule non recourbé après la floraison. Les graines plissées sont à trois angles (OZENDA, 1983) (Fig. 2). La plante est utilisée en tisane, en poudre et en pommade pour les traitements des fièvres, des indigestions, des constipations et des lésions cutanées (HAMMICHE et MAIZA, 2006).

- *Rumex vesicarius* (**Polygonaceae):** C'est une plante herbacée annuelle, ramifiée et feuillue dès la base. Les feuilles sont alternées, un peu charnues, de forme presque triangulaire. Les fleurs sont réunies en grappes de deux ou trois qui sont soudées entre elles par leur pédoncule, à maturité les sépales sont transformés en ailes colorées d'un rose blanchâtre (OZENDA, 1983) (Fig. 3). Elle est consommée crue par la population locale. Elle est surtout appréciée pour son goût acide. Elle est utilisée pour son effet carminatif (BATTANDIER, 1882).

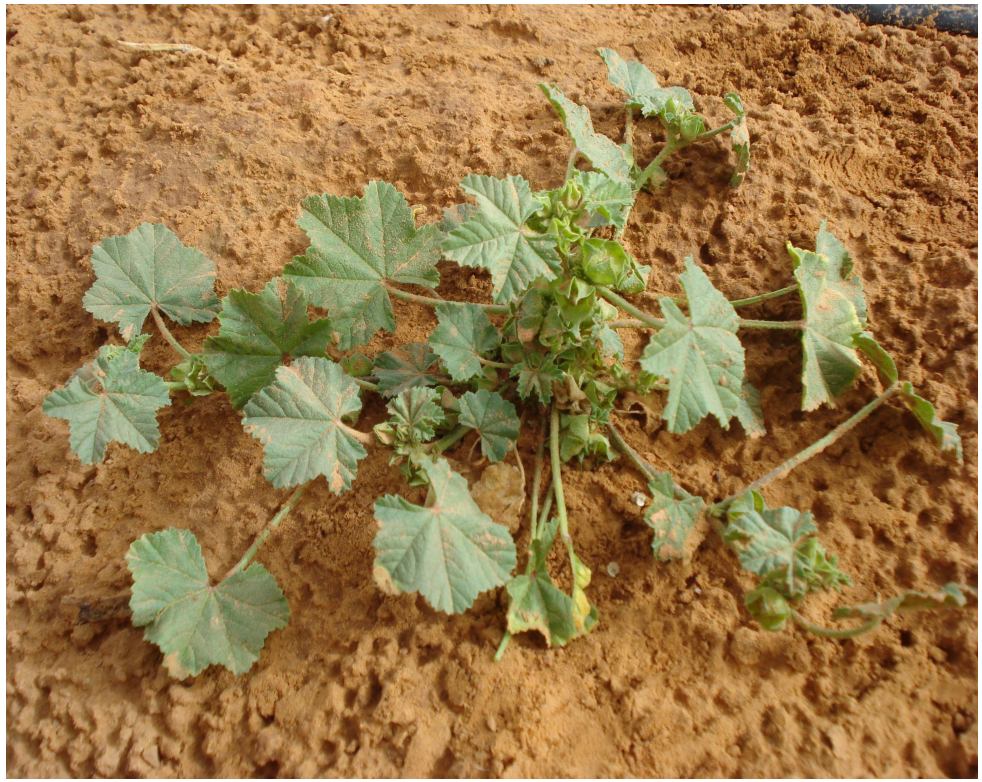


Figure 1- *Malva parviflora* (Malvaceae) de l'Oued Touzouz de la région de Ghardaïa (Photo Originale)

Figure 2- *Asphodelus tenuifolius* (Liliaceae) de l'Oued Nechou de la région de Ghardaïa (Photo Originale)

- *Zizyphus lotus* (Rhamnaceae): Cet arbuste épineux, très ramifié, à grosse souche souterraine, de 2 à 4 mètres de haut; présente des tiges à longs rameaux flexueux, en zigzag, d'un blanc grisâtre. Les feuilles sont simples, ovales, lancéolées, d'un vert clair. Les fleurs sont petites, vert jaunâtre, en grappe axillaire. Le fruit est sphérique de la grosseur d'un pois (OZENDA, 1983) (Fig. 4). Les fruits à pulpe sucrée sont très appréciés. Les feuilles, les fruits et les racines, sont utilisées en décoction et macération comme pectorale, émollient, sédatif et diurétique (OULD EL HADJ et *al.*, 2003).

- *Plantago notata* (Plantaginaceae): C'est une plante herbacée annuelle, à feuilles allongées. Les nervures principales sont parallèles, à pétiole peu distinct, les fleurs blanches, sont groupées en épis à l'extrémité des hampes dépourvues de feuilles. La bractée et les sépales à longs poils, donnent à l'épi un aspect laineux. Les sépales sont sans nervure (OZENDA, 1983) (Fig. 5). La poudre des feuilles est employée comme cicatrisante des blessures, pour les traitements des inflammations de la gorge et des ulcères. Elle est utilisée en macération pour le traitement des constipations (VOISIN, 1987).

Figure 5 - *Plantago notata* (Plantaginaceae) de l'Oued Nechou de la région de Ghardaïa (Photo Originale)

2.3.2.- Echantillonnage des espèces végétales

Après le choix des stations basées sur les facteurs écologiques les plus discriminants de la végétation, notamment la géomorphologie et le sol. Des relevés phytoécologiques sont effectués sur l'ensemble de l'aire de répartition des plantes

spontanées dans la région. Le choix des relevés, repose sur un échantillonnage tenant compte de la structure de la végétation où le critère d'homogénéité floristico-écologique reste privilégié. Pour une bonne réussite de l'échantillonnage, la saison où le développement et la diversité floristique sont maxima, notamment pour les espèces annuelles, est retenue. La floraison des espèces pérennes facilite leur identification (OZENDA, 1983). Les espèces spontanées sont récoltées dans différents oueds de la région de Ghardaïa entre les mois de Février et Avril. Les plantes après la récolte sont transportées au laboratoire pour analyse dans des sacs en papier kraft où sont notées toutes les informations concernant les plantes.

2.3.3.- Technique de séchage

Les feuilles, une fois séparées des rameaux, sont séchées à l'abri de la lumière, sous ventilation à l'air libre et à température ambiante (DIALLO et *al.*, 2004); durant trois semaines. Les feuilles ainsi séchées sont conservées dans des boites dans un milieu sec à l'abri de la lumière jusqu'à leur étude.

2.4.- Etude des polysaccharides

2.4.1.- Extraction des polysaccharides

Les feuilles séchées sont écrasées et prétraitées par de l'éthanol 75% pendant 5 heures (DIALLO et *al.*, 2002), à température ambiante et sous agitation douce; puis filtrées au travers d'un tamis de porosité 100 µm, afin d'éliminer les composés solubles dans l'éthanol, tels que les polyphénols, les oligosaccharides, les oses simples et les acides aminés (WU et *al.*, 2007). Le résidu des feuilles prétraitées, est séché une seconde fois à l'abri de la lumière, sous ventilation à l'air libre et à température ambiante pendant 48 heures (DIALLO et *al.*, 2002). Les feuilles ainsi séchées sont macérées dans 2 volumes de l'eau distillée froide, pendant 24 heures à la température ambiante. Le mélange est filtrée à travers un tamis de porosité 100 µm. Le filtrat est concentré à 60°C jusqu'à l'obtention du *1⁄3* du volume initial, dans un évaporateur rotatif (EBRINGEROVA et *al.*, 2003). Les polysaccharides du concentrât sont précipitées à l'aide de 3 volumes éthanol à 75% pendant 24 heures à une température de 4°C (EBRINGEROVA et *al.*, 2003). Après centrifugation à 3560g pendant 10 mn (EBRINGEROVA et *al.*, 2003 ; SEPULVEDA et *al.*, 2006), le culot est récupéré puis lavé 3 fois par éthanol à 75% (EBRINGEROVA et *al.*, 2003), avant d'être séché par

lyophilisation (BIRINGANINE et *al*., 2004). Le lyophilisat obtenu représente l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles, pour l'étude de la composition qualitative et quantitative des polysaccharides bruts.

2.4.2.- Composition des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles

Les principaux constituants chimiques des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des échantillons de plantes, sont caractérisés par des réactions colorées. Il s'agit du taux de protéines, de la teneur en oses constitutifs, neutres et acides. Par contre pour déterminer la teneur en cendres, l'humidité, ainsi que la teneur en matière sèche de chaque plante on fait appelle à des techniques physico-chimiques.

2.4.2.1.- Détermination de la teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche est déterminée après séchage à 103 ± 2 °C dans une étuve à la pression atmosphérique jusqu'à masse constante (AUDIGIE et *al*., 1984). La teneur en matière sèche est calculée d'après la formule:

$$X = \frac{G_2 - G}{G_1 - G} \times 100\ \%, \text{ où}$$

X: Matière sèche
G : Poids du creuset en porcelaine sec en g
G_1: Poids du creuset avec la prise d'essai avant séchage en g
G_2 : Poids du creuset avec la prise d'essai après séchage en g

2.4.2.2.- Détermination de l'humidité

L'humidité est déterminée par une dessiccation du lyophilisat à la température de 103 ± 2 °C dans une étuve à la pression atmosphérique, jusqu'à masse constante (AUDIGIE et *al*., 1984). La teneur en eau est exprimée en pourcentage massique de l'extrait brut selon la formule:

$$\rho = \frac{m_3 - m_2}{m_1 - m_2} \times 100 \text{ (en g/ 100 g de l'extrait brut).}$$

ρ: Teneur en eau
m_1: Poids du creuset sec en g
m_2: Poids du creuset avec la prise d'essai avant séchage en g
m_3: Poids du creuset avec la prise d'essai après séchage, en g

2.4.2.3.- Détermination de la teneur en cendres totales

Les cendres totales sont déterminées par incinération des extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles lyophilisés de chaque plante dans un four à moufle électrique de type Heraeus 6072. La teneur en cendres totales est calculée selon la formule:

$$X=\frac{G-G_1}{g} \cdot 100\ \%, \text{ où}$$

X: Cendres totales
G : Poids du creuset avec la cendre en g
G_1: Poids du creuset à sec en g
g : Poids de la prise d'essai en g

2.4.2.4.- Dosage des protéines

La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Bradford. La concentration en protéines est obtenue par référence avec une gamme étalon de sérum albumine bovine, après coloration au bleu de Coomassie par interactions non covalentes avec les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines (AUTRAN, 1991).

2.4.2.5.- Dosages des oses neutres et des oses acides

La quantification des oses constitutifs des polysaccharides s'effectue essentiellement par des dosages colorimétriques. Ils reposent sur la réaction des dérivés furfuriques obtenus par action à chaud, d'un acide concentré comme l'acide sulfurique (H_2SO_4), pour divers composés aromatiques, telle que le résorcinol (1,3-dihydroxybenzène) pour le dosage des oses neutres (MONSIGNY *et al.*, 1988), et le méta-hydroxydiphényle pour le dosage des acides uroniques (BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN, 1973). C'est en présence d'acide sulfurique concentré et à chaud, que les liaisons glycosidiques des polysaccharides subissent une hydrolyse quantitative. La déshydratation des unités osidiques libérées conduit à la formation de dérivés furfuriques. C'est par condensation que les composés phénoliques : résorcinol et méta-hydroxydiphényle, interviennent lors du dosage (MONSIGNY *et al.*, 1988). La mesure des absorbances, à 525 nm pour les oses acides et à 540 nm pour les oses neutres, sont effectuées par un spectromètre Ultraviolet type LNICAMYEAR-2000. La concentration

en oses neutres est obtenue par référence à une gamme étalon d'arabinose et celle des oses acides avec une gamme étalon d'acide glucuronique (MONSIGNY *et al.*, 1988).

2.4.3. - Caractérisation des polysaccharides

2.4.3.1. - Analyse Infrarouge

L'analyse Infrarouge d'un échantillon d'origine biologique permet de révéler la présence de certains groupements fonctionnels caractéristiques (RUIZ, 2005). La spectrométrie Infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, basée sur l'excitation des molécules par des radiations Infrarouges. L'absorption des rayonnements de nombres d'ondes comprises entre 4000 et 400 cm^{-1} en tant qu'énergie de vibration moléculaire modifie à la fois les états de rotation et de vibration des molécules (BERTRAND ET DUFOUR, 1987). Les spectres Infrarouges des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles sont obtenus par un spectrophotomètre à transformer de Fourier (FT-IR) type Testcan Shimadzu FTIR 8000 series.

2.4.3.2. - Caractérisation des résidus glycosidiques

Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse (RUIZ, 2005). Les monosaccharides libérés sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) puis par chromatographie échangeuse d'anions haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD).

2.4.3.2.1. - Hydrolyse des liaisons glycosidiques

Pour la caractérisation des résidus glycosidiques, une déstructuration importante des polymères s'avère nécessaire, sans toutefois en altérer irréversiblement la structure des oses constitutifs.

La dépolymérisation peut être conduite avec des concentrations variables en acides sous diverses conditions opératoires (température, temps de réaction), selon la nature et la structure du polysaccharide. Le suivi cinétique d'une hydrolyse est une étape préliminaire indispensable pour définir les conditions optimales de la libération des oses simples et d'oligosaccharides. Les modalités pratiques de la mise en oeuvre de l'hydrolyse sont définies en termes de concentration en acide trifluoroacétique 2 M et 4 M sur une

période de 5 heures à 100°C d'une part. D'autre part, en fonction de la température à 80 °C et 100 °C tout en gardant la concentration en acide trifluoroacétique fixe à 4 M durant 5 heures. L'évolution du profil est suivie par chromatographie sur couche mince.

2.4.3.2.2. - Chromatographie sur couche mince des résidus glycosidiques

La chromatographie sur couches minces (CCM) est une méthode d'analyse couramment utilisée pour l'identification de composés organiques, et permet un contrôle aisé et rapide de la pureté des produits analysés (AUTRAN, 1991). De plus, étant donné que la CCM indique le nombre de composants d'un mélange, semble employer pour suivre la progression d'une réaction comme dans le cas de l'hydrolyse de polysaccharides (DELATTRE, 2005).

Pour la présente étude, il sera utilisé différents étalons oses que peuvent renfermer les polysaccharides. Il s'agit du galactose, de l'arabinose, du glucose, du xylose, du mannose, du fructose et de l'acide glucuronique (Sigma). Pour les solutions, il est dissout 25 mg de chaque ose dans 2,5 ml d'eau distillée (DOAT, 1974).

Les plaques chromatographiques utilisées sont prêtes à l'emploi. Ce sont des plaques en gel de silice type Silica gel 60 F 254 de 0.25 mm d'épaisseur, sur feuille de verre (WANG et FANG, 2004). Pour l'étude deux phases mobiles sont utilisées:
- Le premier système: Butanol- Acide acétique- Eau, dans les proportions de 2-1-1(RUIZ, 2005).
- Le deuxième système: Isopropanol- Acétate d'éthyle- Eau, dans les proportions de 6-3-1 (WANG et FANG, 2004).

Le réactif de révélation des spots est le réactif de Nigrum. Après chauffage à l'étuve à 105°C pendant 10 à 15 mn les aldohexoses donnent une coloration bleuâtre, les aldopentoses donnent une coloration verdâtre. Les cétoses donnent une coloration rougeâtre (PAULSEN et *al.,* 2002).

2.4.3.2.3.- Chromatographie échangeuse d'anions haute performance (HPAEC) à détection ampérométrique pulsée (PAD) des résidus glycosidiques

La chromatographie échangeuse d'anions haute performance (HPAEC) à détection ampérométrique pulsée (PAD) permet de confirmer les compositions en oses constitutifs

des différents extraits de polysaccharides hydrosolubles et donner les pourcentages en oses de chaque extrait, en se basant sur les temps de rétention des oses références (Sigma). Les différents oses sont identifiés par leur temps de rétention spécifique et quantifiés après intégration du signal (Chromeleon management system Dionex) (WARRAND, 2004), par comparaison avec les monosaccharides de référence.

2.4.3.2.3.1.-Principe

La chromatographie échangeuse d'ion peut être appliquée pour analyser des glucides à cause de ces propriétés ioniques. Les glucides hydrosolubles se comportent comme des acides faibles avec pKa plus de 11, donc les groupements hydroxyles des oses dans le milieu alcalin peuvent s'ioniser en oxyanions ($R\text{-}O^-$). Les oses serons alors séparables selon leur pka et leur affinité avec la phase stationnaire NR_4^+ de la colonne qui joue le rôle d'échangeur d'anions (KAMERLING et *al.*, 2007).

La détection ampérométrique pulsée (PAD) associée à l'appareil permet une détection de l'ordre d'une dizaine de picomoles. Les composés passent en sortie de colonne dans une cellule de mesure munie d'une cathode et d'une anode en or. Ils serons alors attirés par l'une ou par l'autre des électrodes produisant un courant électrique enregistré par le conductimètre: le potentiel de mesure. Afin d'éviter tout encrassement des électrodes par dépôt des molécules analysées, un potentiel de nettoyage (potentiel d'oxydation maximal puis potentiel de réduction maximal) est envoyé régulièrement entre les deux électrodes. Cela entraîne la désorption des produits d'oxydation des glucides et permet après réduction de l'oxyde d'or à la surface de l'électrode en or, la détection au cycle suivant du premier potentiel (KAMERLING et *al.*, 2007).

L'appareillage est un système Dionex (Dionex corporation, sunnyvale (CA), USA) composé d'une unité de dégazage de l'éluant, d'une pompe pouvant fonctionner en gradient et d'un détecteur électrochimique pulsé (P.E.D. 50) à électrode en or. Le système est également muni d'un injecteur automatique. Les colonnes utilisées sont des colonnes spécifiques Dionex comprenant une précolonne (4× 75 mm) et une colonne analytique CarboPac PA 1 (4× 250 mm) dont la phase fixe est constituée de billes de divinylbenzène de 10 µm enrobées de latex et présentant des groupements ammonium quaternaires (KAMERLING et *al.*, 2007).

2.4.3.2.3.2.- Préparation des échantillons

Les polymères (3 mg, 0.6% m/v) sont placés dans des tubes hermétiques pour être hydrolysés à l'acide trifluoroacétique 4 M pendant 5 heures à 80°C dans un bain marie à sec thermostaté. Ils sont ensuite lyophilisé et remis en solution dans 1 ml d'eau distillée.

2.4.3.2.3.3.- Application d'HPAEC-PAD

On injecte 25 µl de l'échantillon. L'élution est ensuite réalisée à un débit de 1ml/ mn selon deux méthodes en fonction du type d'ose analysé. Les éluants sont réalisés à l'aide d'eau distillée et dégazés à l'hélium.

Une élution isocratique à l'aide d'une solution de NaOH 16 mM (Baker Analytical grade, solution de soude décarbonatée à 50% m/v) est réalisée dans le cadre de l'analyse des monosaccharides de type neutre.

D'un autre coté, les acides uroniques, qui présentent des capacités supérieures de fixation sur la colonne, seront élués en utilisant un gradient d'acétate de sodium 600 mM (solvant B) dans NaOH 16 mM (solvant A). L'acétate de sodium a pour effet de déplacer de manière progressive les monosaccharides fixés sur la phase stationnaire du fait du nombre important de leurs fonctions $R\text{-}O^-$.

On utilise le gradient suivant en 4 étapes:

1) 10mn : 0% de B-100% de A
2) de 10 à 40 mn : de 0% à 100% de B
3) Plateau de 40 à 45 mn : 100% de B
4) de 45 à 60 mn : de 100 à 0% de B

Après détection, les différents oses sont identifiés par leur temps de rétention spécifique et quantifiés après intégration du signal (Chromeleon management system Dionex) (WARRAND, 2004), par comparaison avec des courbes étalons établies avec les monosaccharides de référence (Sigma) Tableau 04**.**

Tableau 4- Détermination de l'ordre, de type, et de temps de rétention des monosaccharides standards

Ordre et type de monosaccharide		Temps de rétention (mn)
1	Rhamnose	10,28
2	Arabinose	11,97
3	Galactose	15,92
4	Glucose	16,32
5	Mannose	17,23
6	Xylose	18,75
7	Fructose	19,22
8	Acide glucuronique	32,73

2.4.4. - Activité biologique des hydrolysats des polysaccharides

Les oligosaccharides issus des extraits des différents échantillons de plantes spontanées à caractère médicinal, sont décrits comme étant des régulateurs biologiques actifs, sur des mécanismes tels que la croissance, le développement cellulaire, la symbiose et les réactions de défense. Les fructooligosaccharides, les galacto-oligosaccharides, les xylo-oligosaccharides, et les arabinogalactooligosaccharides ont été étudiés pour leur action prébiotique. Ce terme, désigne des additifs ou des compléments alimentaires non digestibles qui affectent de façon bénéfique l'hôte en stimulant sélectivement la croissance ou l'activité de certaines bactéries intestinales. Actuellement les études tendent vers l'application de nouvelles familles d'oligosaccharides prébiotiques. Les recherches ont axé sur l'utilisation d'oligosaccharides issus de dégradation de polysaccharides naturels (DELATTRE, 2005). Face à ce constat, tester l'activité des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle par l'acide trifluoroacétique des 5 extraits polysaccharidiques s'impose.

L'activité des hydrolysats des extraits bruts polysaccharidiques sur la souche étudiée est définie comme les concentrations inhibant ou activant, après 24 heures de contact à 37 °C, toute croissance bactérienne mesurée par absorbance à la longueur d'onde de 620 nm (BERCHE et *al.*, 1988). Cette mesure est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de type Clinical Chemistry System RA-50 contre une référence

constituée de milieu de culture stérile. La mesure de l'activité est effectuée au laboratoire de la clinique des Oasis Ghardaïa.

2.4.4.1. - Souche Bactérienne

La souche bactérienne utilisée est une *Klebsiella pneumonea pneumonea*, du laboratoire de microbiologie de la clinique des Oasis de la localité de Ghardaïa. Le choix à porter sur les Klebsiella, car ce sont des gros bacilles à Gram négatif, immobiles, entourés d'une capsule de nature polysaccharidique. Ils appartiennent à la famille des Enterobactériacae. De même, ce sont des bactéries commensales vivant dans le tube digestif de l'homme et des animaux (BERCHE et *al.*, 1988).

2.4.4.2. - Milieu de culture

La souche *Klebsiella pneumonea pneumonea* est cultivée sur milieu classique Trypticase-Soja Bouillon (TSB). Il est constitué de 17 $g.l^{-1}$ peptone trypsique de caséine, 3 $g.l^{-1}$ peptone papaïnique de soja, 2,5 $g.l^{-1}$ de glucose, 5 $g.l^{-1}$ de NaCl et de 2,5 $g.l^{-1}$ de phosphate dipotassique. Le milieu est autoclavé à 121 °C pendant 15 mn. Le pH final est de 7,3 (MARCHAL et *al.*, 1987).

Chapitre III.
Résultats et discussions

3.1.- Caractérisation des extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de différentes plantes échantillonnées

Les résultats d'analyses physico-chimiques des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles de feuilles des plantes spontanées à caractère médicinal, sont représentés sur le tableau 2. Il apparaît que les rendements massiques d'extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des plantes échantillonnées, se situent entre 0,49% chez *Zizyphus lotus* et 1,46% chez *Malva parviflora* et *Plantago notata*. Le rendement d'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* est de 1,46%, proche de celle de *Malva mavritana* (Malvaceae) soit 2% rapporté par ATKHAMOVA et *al.* (1997). Le rendement d'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles chez *Plantago notata* soit 1,46%, est inférieur à celle des feuilles de *Plantago major* (Plantaginaceae) qui est de 6 à 7%, selon BRUNETON (1999). De même chez *Asphodelus tenuipholius* est rapporté 0,65% de rendement massique de polysaccharides hydrosolubles extraits des feuilles, semble faible par rapport à celle d'*Opuntia ficus indica* (Liliaceae), soit 1,33 % (SEPULVEDA et *al.*, 2007).

Certes, le rendement massique de polysaccharides hydrosolubles d'extraits des feuilles dépend de l'état éco-physiologique de la plante, notamment l'accumulation de fructane chez la chicorée est induite en cas de stress hydrique et nitrique. En outre, ce polymère est dégradé au cours de refleurissement de la plante au printemps (BUCKERIDGE et *al.*, 2000). De même, le type de polysaccharide et la procédure d'extraction comme la décoction, la macération, le type et la quantité de solvant, etc., agissent aussi sur le rendement massique de polysaccharides hydrosolubles d'extraits des feuilles (EBRINGEROVA et *al.*, 2003).

Parallèlement, l'humidité des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de plantes échantillonnées, varie de 11,23 ± 1,77% pour *Rumex vesicarius* à 22,66 ± 3,21% chez *Malva parviflora*. GUO et *al*. (2007) signalent 6,83 ± 0.04% d'humidité pour l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Plantago psyllium* (Plantaginaceae), comparée celle pour *Plantago notata* soit 12,85 ± 3,43%; elle semble de moitié. SEPULVEDA et *al.* (2007), signalent 4.9 ± 0.6% d'humidité dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de cladodes d'*Opuntia ficus indica* (Liliaceae), alors qu'*Asphodelus tenuipholius* renferme 18,33 ± 2,08 %.

LI et *al*. (2007a) remarquent 18,99 ± 1.23% d'humidité dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus jujuba* (Rhamnaceae), semble très proche de celle de *Zizyphus lotus* qui est de 19,81 ± 0,99%. Selon la figure 6 est remarqué une proportionnalité des valeurs d'humidité avec l'ordre d'extraction, notamment le premier extrait est celle de *Malva parviflora* qui représente la plus grande valeur d'humidité 22,66 ± 3,21%, le deuxième extrait est d'*Asphodelus tenuipholius* avec une teneur d'humidité moindre 19,81 ± 0,99%, suivie du troisième extrait 18,33 ± 2,08% chez *Zizyphus lotus*, puis 12,85 ± 3,43% et 11,23 ± 1,77% d'humidité dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Plantago notata* et de *Rumex vesicarius* respectivement.

Les teneurs en cendres dans les extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de plantes échantillonnées, se situent entre 11,66 ± 3,78% dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus lotus* et 50,33 ± 0,57% dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Rumex vesicarius* (Fig. 6). LI et *al*. (2007a) trouvent 2.26 ± 0.03% dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Zizyphus jujuba* (Rhamnaceae), alors *Zizyphus lotus* en a 11,66 ± 3,78%. KARDOSOVA et MACHOVA (2006) signalent dans l'extrait de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Aloae barbadens* (Liliaceae) 27,9% de cendres, il est remarqué dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Asphodelus tenuipholius* 23,66 ± 1,52%. Les techniques de purification au cours de l'extraction ont une action sur la teneur en cendres, notamment la dialyse pendant 48 heures de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Plantago ovata* (Plantaginaceae) effectuée par GUO et *al*. (2007), montre 4.07 ± 0.02% de cendres, inférieure à celle de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* soit 29,33 ± 3,05%. De même, la richesse des feuilles de *Rumex vesicarius* en sels minéraux, notamment de potassium et de calcium selon ALFAWAZ (2006), reflète sur la teneur en cendres de l'extrait polysaccharidique qui représentent 50,33 ± 0,57%. *Rumex vesicarius* est très riche en acide oxalique, qui forme des cristaux avec les ions minéraux dans les cellules de parenchyme foliaire. Ces cristaux semblent précipiter avec les polysaccharides au cours de l'extraction (ALFAWAZ, 2006).

Les teneurs moyennes en protéines des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des 5 plantes échantillonnées, sont de 21,46 ± 0,25% pour *Rumex vesicarius*, 26,13 ± 0,37% pour *Asphodelus tenuipholius*, 27,14 ± 1,43% pour *Malva parviflora*, 27,28 ± 0,58% pour *Zizyphus lotus* et 29,49 ± 0,61% pour *Plantago notata* (Fig. 6).

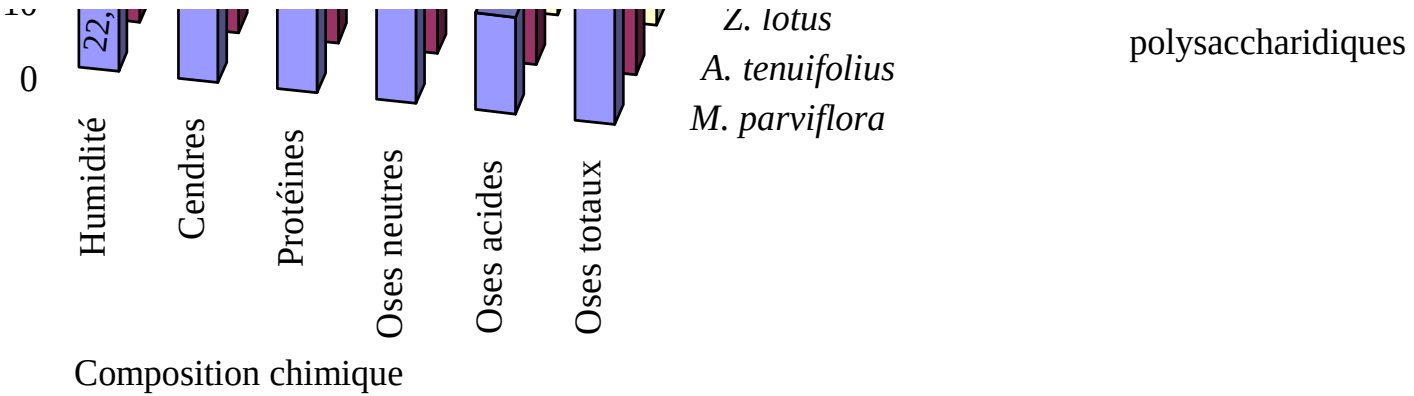


Figure 6- Compositions des extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles des feuilles des plantes spontanées à caractère médicinal échantillonnées

La valeur de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus jujuba* (Rhamnaceae), rapportée par LI et *al*. (2007a), soit 5,01 ± 0.05% de protéines, semble faible par rapport à celle de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus lotus* soit 27,28 ± 0,58%. SEPULVEDA et *al.* (2007), notent 14,2% de protéines dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des cladodes d'*Opuntia ficus indica* (Liliaceae), paraît inférieur à celle d'*Asphodelus tenuipholius* soit 26,13 ± 0,37%. ALFAWAZ, (2006) rapporte 18.6 ± 0.9% de protéines dans l'extrait aqueux des feuilles de *Rumex vesicarius*. C'est une valeur inférieure de celle remarquée dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Rumex vesicarius* qui est de 21,46 ± 0,25% (Fig. 6).

La teneur moyenne des extraits polysaccharidiques en oses totaux, se situe entre 12,95 ± 0,6% dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de *Rumex vesicarius* et 40,87 ± 0,83% dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Zizyphus lotus*. La faible teneur en oses totaux dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de *Rumex vesicarius* soit 12,95 ± 0,6% par rapport à celle de l'extrait aqueux des feuilles de *Rumex vesicarius* 52,6% mentionné par ALFAWAZ (2006), émane de la richesse en oses simples et en oligosaccharides de la plante, solubles dans l'éthanol. ATKHAMOVA et *al*. (1997), trouvent 52,2% d'oses totaux dans l'extrait polysaccharidique des feuilles de *Malva mavritana* (Malvaceae). Cette valeur est le double de celle obtenue dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* soit 28,18 ± 0,94%. L'étude de DIALLO et *al*. (2004) sur les polysaccharides de macéré et de décocté des feuilles de la *Zizyphus mauritiana* (Rhamnaceae), donne des teneurs en oses respectivement de 27,18 % et 36,87%. Ces valeurs semblent inférieures à celle de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de *Zizyphus lotus* 40,87 ± 0,83%. Cependant, suite à une double précipitation des polysaccharides des feuilles de *Zizyphus jujuba* (Rhamnaceae) effectuée par LI et *al*. (2007a), ils obtiennent des teneurs en oses totaux de 81.62 ± 3.12%, supérieures à celles de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus lotus* soit 40,87 ± 0,83% (Fig. 6).

Les teneurs des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles en oses acides dans les plantes échantillonnées se situent entre 6,99 ± 0,28% et 16,63 ± 0,38% chez *Rumex vesicarius* et *Plantago notata* respectivement. L'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Malva parviflora* représente 12,67 ± 0,42% d'oses acides, est inférieur à celle de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de

feuilles de *Malva mavritana* (Malvaceae), soit 16,5% rapporté par ATKHAMOVA et *al*. (1997). De même, la teneur de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus lotus* en oses acides semble représenter la moitié de celle des feuilles de *Zizyphus mauritiana* (Rhamnaceae), soit 23,49% selon DIALLO et *al*. (2004).

Le rapport des pourcentages [oses acides] / [oses neutres] dans les extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des plantes échantillonnées est variable. Il est de 0,40 à 1,17 dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Zizyphus lotus* et de *Rumex vesicarius* respectivement. Pour l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora*, le rapport est 0,81 très proche de ce de *Malva mavritana* (Malvaceae) soit 0,91, selon ATKHAMOVA et *al*. (1997). Quant à l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de *Zizyphus lotus*, le rapport 0,40 est inférieur à ce de l'extrait polysaccharidique des feuilles de *Zizyphus mauritiana* (Rhamnaceae), soit 0,93, selon DIALLO et *al*. (2004). Le rapport est de 1,04 pour l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Plantago notata*, est très appréciable par rapport à celle de *Plantago psyllium* (Plantaginaceae) soit 0,23 (GUO et *al*., 2007).

3.2.- Caractérisations des polysaccharides des extraits bruts des différentes plantes échantillonnées

3.2.1.- Groupements fonctionnels caractéristiques des polysaccharides

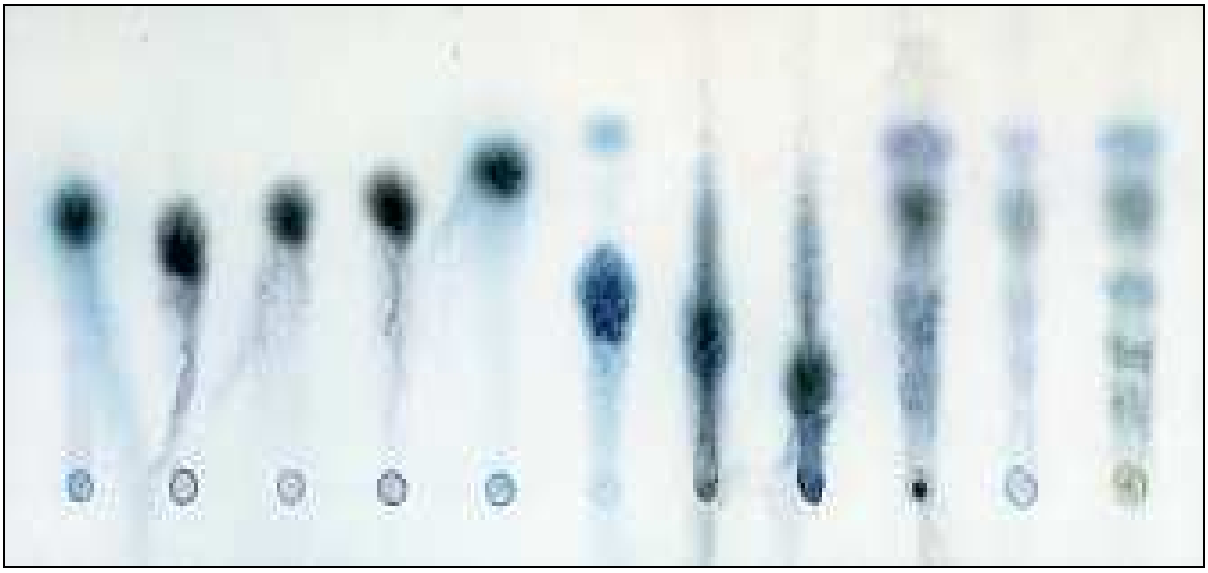
Les figures 7, 8, 9, 10 et 11 représentent l'empreinte de la spectrométrie à Infrarouge des extraits de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Malva parviflora*, *Asphodelus tenuipholius, Zizyphus lotus*, *Rumex vesicarius*, et *Plantago notata* respectivement. Les spectres Infrarouges des extraits de polysaccharides hydrosolubles, laissent apparaître une bande d'absorption large à 3400 cm^{-1} qui semble correspond à la vibration de type élongation du groupement hydroxyle selon les études de WU et *al*. (2007). Les nombres d'ondes 2925 cm^{-1} et 1383 cm^{-1} semblent correspondre aux deux types de vibration du groupement C–H élongation et déformation respectivement. La présence de pics à 1740 cm^{-1} et 1269 cm^{-1} dans les extraits de *Zizyphus lotus*, *Rumex vesicarius*, et *Plantago notata* semble correspondre au groupement carboxyle estérifié (-COOR). Les pics à 1622 cm^{-1} et 1416 cm^{-1}dans les mêmes extraits semblent correspondre aux groupes des anions carboxyliques ($–COO^{–}$) (WU et *al*., 2007). Parallèlement, on observe des pics vers 3600 cm^{-1} et à 1640-1560 cm^{-1} qui semblent correspondre au

groupement amide (N-H élongation et déformation), ce qui confirme la présence de protéines (KARDOSOVA et MACHOVA, 2006). Le pic à 1080 cm^{-1} correspond à la vibration de type déformation du groupement hydroxyle –OH (LI et *al*., 2007b). Chaque extrait de polysaccharides a des bandes spécifiques dans la région 1200–800 cm^{-1} (WU et *al*., 2007). Cette région est caractérisée par le chevauchement des pics de vibration et de rotation du groupement (C–OH) des oses et de vibration de la liaison osidique (C–O–C) (WU et *al*., 2007).

3.2.2.- Caractérisation qualitative des résidus glycosidiques

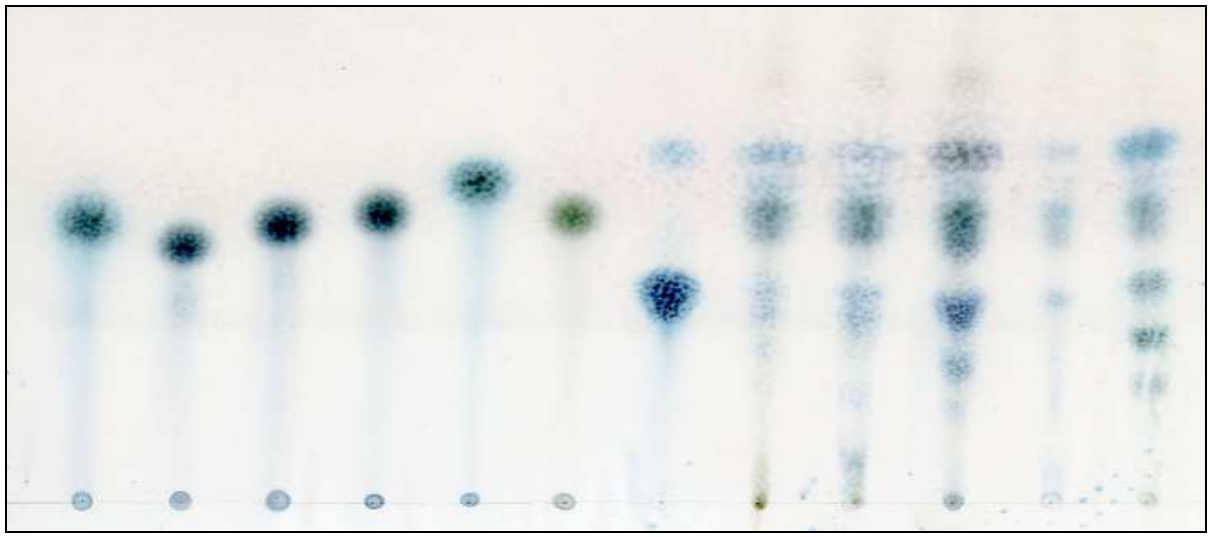
Au vu des figures 12 et 13, les résultats montrent une variation d'hydrolyse des polysaccharides. L'hydrolyse à 4 M montre une dépolymérisation notable par rapport à celle de 2 M. Le profil chromatographique de l'hydrolysat de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *Malva parviflora* (Fig. 12), montre une bande de facteur de rétention (R_f) de 0,24 avec des traînés au parcourt de tache, par rapport à 6 ou 7 bandes de R_f variable de 0,23 à 0,66 pour l'hydrolyse à 4 M (Fig. 13). Pour *Asphodelus tenuipholius,* se remarque une seule bande de R_f 0,17 (Fig. 12) face à 7 bandes de R_f variable de 0,08 à 0,66 (Fig. 13). L'hydrolyse à 4 M de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de *Zizyphus lotus* représente 7 bandes au lieu de 4 bandes avec des traînés, au cours de l'hydrolyse à 2 M. L'hydrolyse à 2 ou 4 M de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Plantago notata,* montrant l'apparition de 6 bandes pour l'hydrolyse à 4 M présentant une bonne résolution. Ceci renseigne sur la grande labilité des polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata*. Pour *Rumex vesicarius* est remarqué la disparition des bandes dans le cas de l'hydrolyse à 4 M qui représente 4 bandes au lieu de 6 bandes dans l'hydrolyse à 2 M. Les 2 bandes de l'hydrolyse à 2 M semblent correspondre aux fractions d'oligosaccharides, dont l'hydrolyse par une concentration en acide plus élevé comme 4 M par rapport à 2 M libère des oses simples impliqués dans des bandes d'oses simples déjà existant.

En raison de la grande labilité (RUIZ, 2005) des polysaccharides de différents extraits et le risque d'une altération des oses simples libérés à 4 M et à 100°C, il est suivi la cinétique de leur hydrolyse dans des conditions plus douces, en utilisant de l'acide trifluoroacétique à 4 M mais à 80°C durant 5 heures.



Ara **Gal** **Glc** **Man** **Xyl** **Glc. A** **M** **A** **Z** **R** **P**

Figure 12- Caractérisation par CCM des hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des différentes plantes spontanées à caractère médicinal par l'acide trifluoroacétique, 2 M durant 5 heures à 100°C (M*: M. parviflora,* A: *A. tenuifolius*, R: *R. vesicarius*, Z: *Z. lotus* et P: *P. notata*)

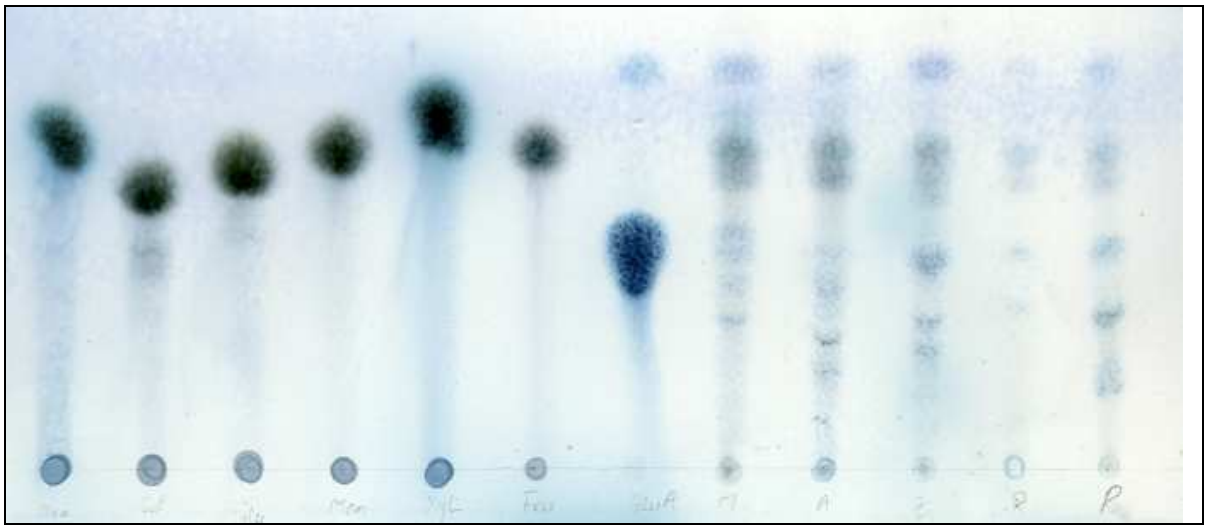


Ara **Gal** **Glc** **Man** **Xyl** **Fru** **Glc. A** **M** **A** **Z** **R** **P**

Figure 13- Caractérisation par CCM des hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des différentes plantes spontanées à caractère médicinal par l'acide trifluoroacétique, 4M durant 5 heures à 100°C. (M*: M. parviflora,*A: *A. tenuifolius*, R: *R. vesicarius*, Z: *Z. lotus* et P: *P. notata*)

L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique dans des conditions opératoires douces entraîne une dépolymérisation notable et une bonne résolution des spots par rapport à celle de 4 M à 100°C. La figure 14, laisse apparaître pour l'extrait de polysaccharides

hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora*, 8 bandes bien distinctes par rapport à 7 bandes dans la figure 13 où 4 bandes ont des R_f très proche et intercalées par des traînés (0.36, 0.41) et (0.52, 0.56). Ceci semble correspondre à une altération des oses. Pour *Asphodelus tenuipholius*, se remarquent 9 bandes séparées par rapport aux 7 bandes en majorité liés entre elles dans les conditions d'hydrolyse 4 M à 100°C pendant 5 heures. De même pour l'hydrolysat de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de *Zizyphus lotus*, il se distingue dans le même emplacement (Fig. 13 et Fig. 14), 3 bandes avec des R_f de 0.46, 0.51 et 0.54, au lieu de 2 bandes larges de R_f de 0.50 et de 0.55 dans les conditions d'hydrolyse 4 M à 100 °C durant 5 heures. Les extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Rumex vesicarius* et de *Plantago notata*, laissent remarquer sur la figure 14 des bandes séparées et bien résolu par rapport à la figure 13. Donc un abaissement de la température d'hydrolyse de 100°C à 80°C, semble préserver la structure des oses.

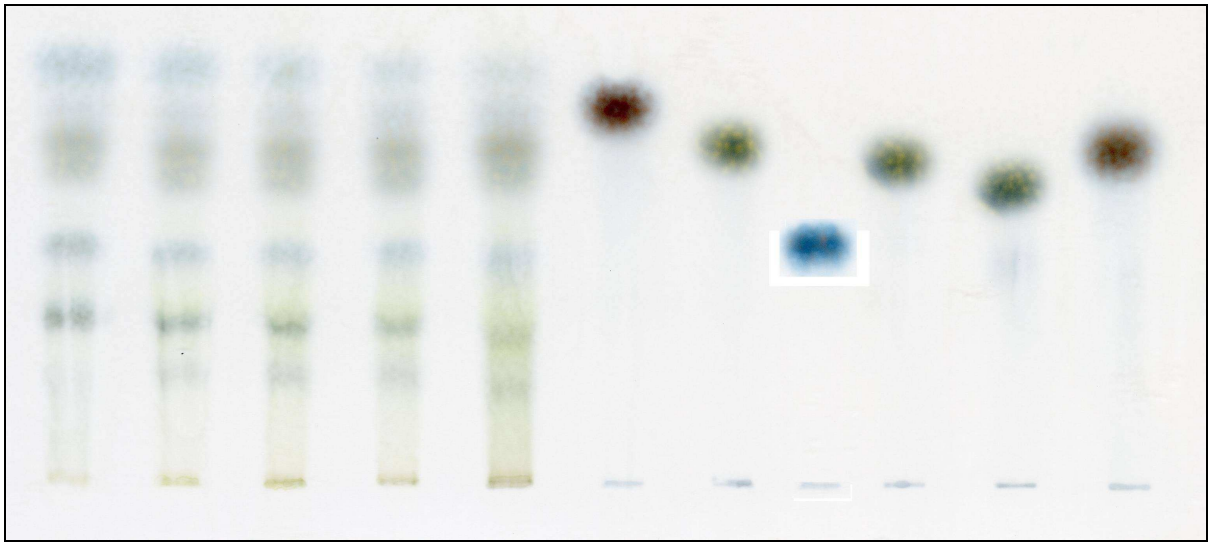


Ara **Gal** **Glc** **Man** **Xyl** **Fru** **Glc A** **M** **A** **Z** **R** **P**

Figure 14- Caractérisation par CCM des hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des différentes plantes spontanées à caractère médicinal. par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C durant 5 heures (M*: M. parviflora*, A: *A. tenuifolius*, R: *R. vesicarius*, Z: *Z. lotus* et P: *P. notata*)

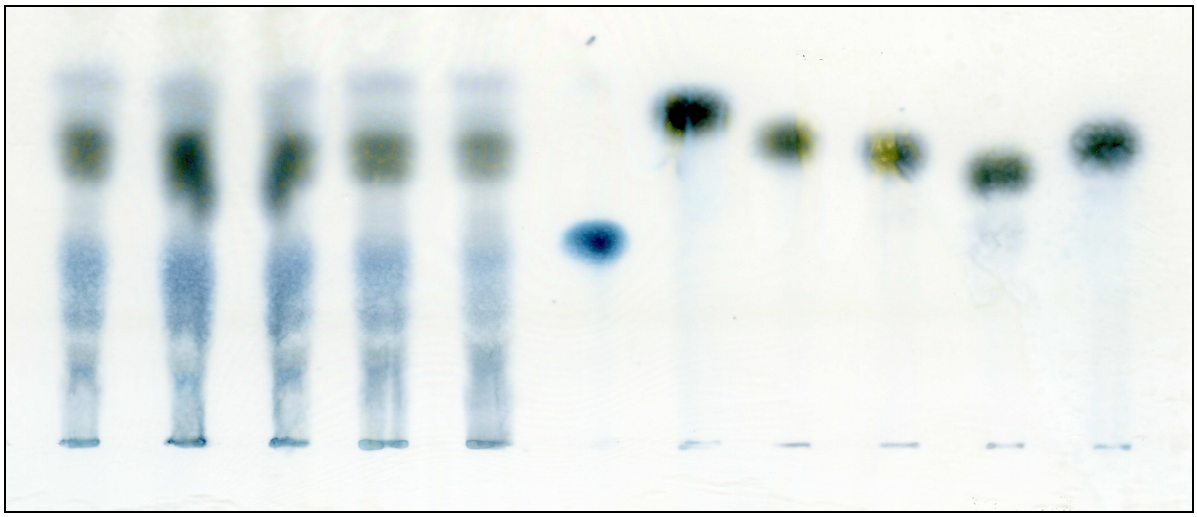
L'emploi d'une solution d'acide trifluoroacétique 4 M, conduit à une hydrolyse significative d'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* après 60 mn de réaction à 80°C, avec apparition de 8 taches (Fig. 15). La concentration de coloration des taches de R_f 0.12 et 0.17 entre 2 et 3 heures semble montrer qu'une augmentation du temps de réaction s'accompagne d'une libération accrue d'entités oligosaccharidiques. La disparition des taches de R_f 0.12 entre 4 et 5 heures, et

le renforcement de l'intensité des autres taches semble indiquer une libération des oses simples; comme l'acide glucuronique, de R_f 0.23, selon KAMERLING et *al.* (2007), les liaisons uronosidyles sont extrêmement stables.



5 h **4 h** **3 h** **2 h** **1 h** **Xyl** **Man** **Glc. A** **Glc** **Gal** **Ara**

Figure 15- Suivi par CCM de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *M. parviflora*



3h **5 h** **4 h** **2 h** **1 h** **Glc. A** **Xyl** **Man** **Glc** **Gal** **Ara**

Figure 16- Suivi par CCM de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C, en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles feuilles de d'*A. tenuifolius*

L'allure générale des taches de la figure 16 après 5 heures, montre une similitude des profils chromatographiques, qui semble montrer la fragilité des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de d'*Asphodelus tenuifolius*. Néanmoins, après 3 heures, se

note l'éclaircissement de la première large tache de R_f 0.08 qui peut s'exprimer par la dégradation des fragments d'oligosaccharides avec la durée de l'hydrolyse. Il se remarque une progression de l'intensité des taches qui correspond aux oses simples, de R_f 0.41, 0.45 et 0.30, ce qui peut traduire l'hydrolyse des liaisons osidiques spécialement les liaisons uronosidyles et la libération des oses simples.

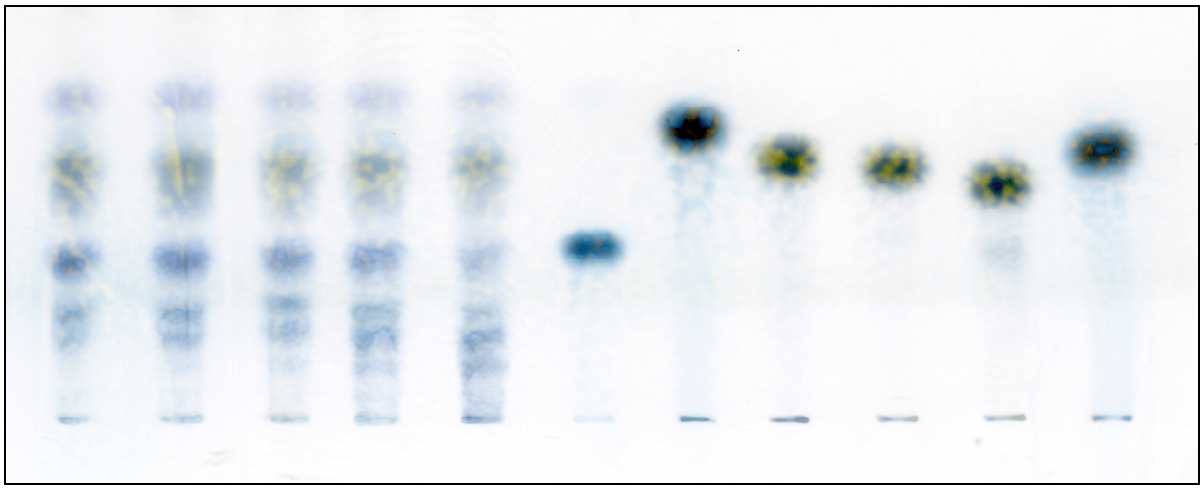
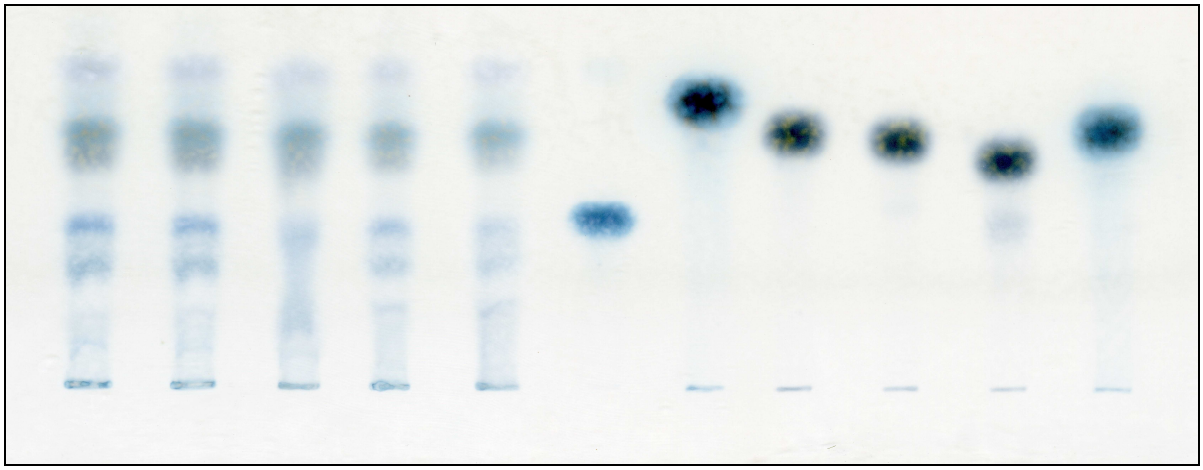


Figure 17- Suivi par CCM de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C, en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *Z. lotus*

Les profils chromatographiques des hydrolysats de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus lotus* (Fig. 17) montrent une richesse et une diversité en oses, simples ou osides. L'hydrolyse après une heure montre 8 taches de R_f variable de 0.08 à 0.50. Après 4 heures d'hydrolyse, se remarque la disparition de tache de R_f 0.08 et le renforcement de l'intensité de la coloration des autres taches.

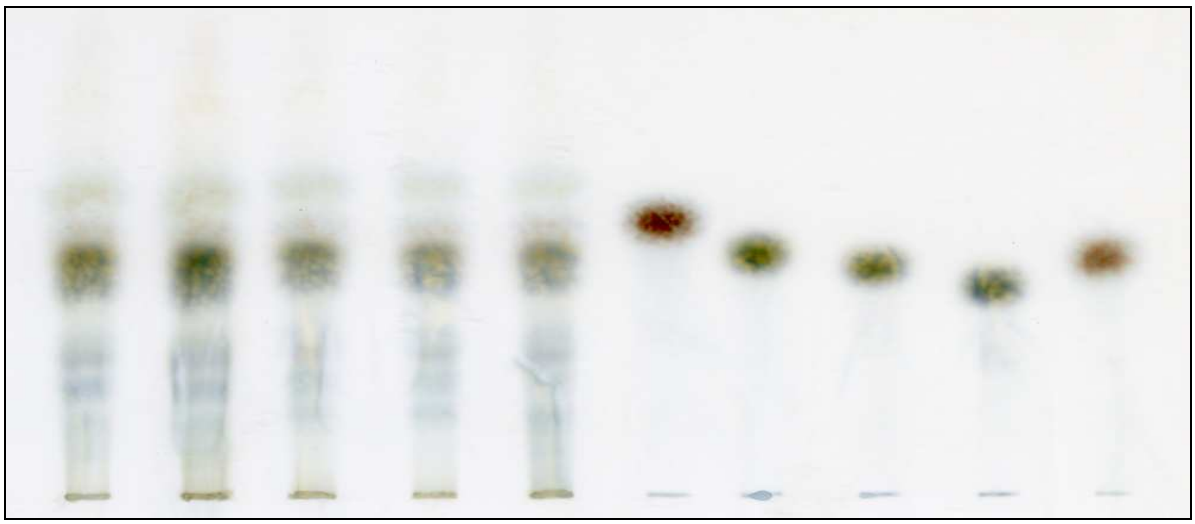
Après une hydrolyse 2 heures, se remarque l'apparition de 6 taches avec une progression de l'intensité de la coloration des bandes (Fig. 18). Cependant, après 3 heures, se note la disparition de la première tache de R_f à 0.11. Celle-ci semble être une fraction d'oligosaccharide dépolymérisée en oses simples suite à la poursuite de l'hydrolyse dans le temps. Ces oses semblent s'impliquer dans le renforcement de l'intensité de la coloration des taches qui correspondent aux oses simples de R_f 0.24, 0.35 et 0.38. Il se ne remarque pas de différence entre les profils chromatographiques durant 4 et 5 heures. L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 M pendant 4 heures semble être suffisante pour hydrolyser les liaisons osidiques de polysaccharides hydrosolubles de

feuilles de *Rumex vesicarius*.



5 h **4 h** **3 h** **2 h** **1 h** **Glc. A** **Xyl** **Man** **Glc** **Gal** **Ara**

Figure 18- Suivi par CCM de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C, en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *R. vesicarius*



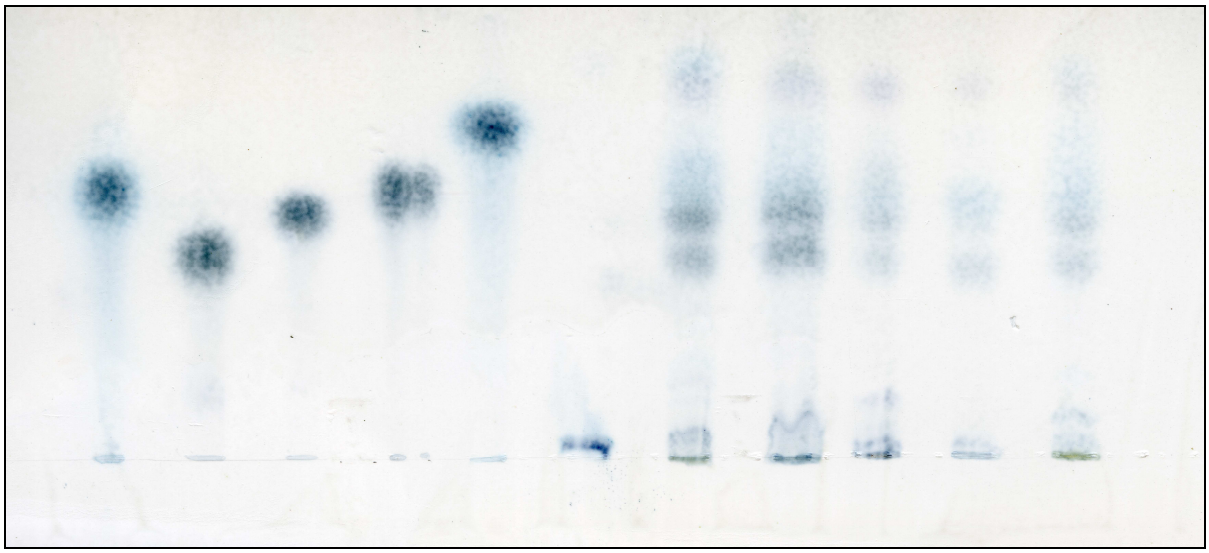
5 h **4 h** **3 h** **2 h** **1 h** **Xyl** **Man** **Glc** **Gal** **Ara**

Figure 19- Suivi par CCM de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C, en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de *P. notata*

Après une heure d'hydrolyse, le profil chromatographique montre 7 bandes de R_f : 0.12, 0.2, 0.31, 0.4, 0.43, 0.5 et 0.57 (Fig. 19). Hors mis, la première tache (R_f = 0.12), toutes les taches persistent et évoluent en intensité. La première tache régresse avec le temps jusqu'à disparition totale après 5 heures. Il semble être un fragment d'oligosaccharide dépolymérisé suite à l'hydrolyse.

L'hydrolyse des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora*, *Asphodelus tenuifolius*, *Zizyphus lotus* et *Plantago notata* par une solution d'acide trifluoroacétique 4 M à une température de 80°C durant 5 heures, permet l'obtention d'une dépolymérisation notable des polysaccharides, avec des quantités importantes d'oses constitutifs natifs. Une durée d'hydrolyse de 4 heures, par une solution d'acide trifluoroacétique 4 M, à une température de 80°C semble suffisante pour la déstructuration et la libération des oses constitutifs natifs de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Rumex vesicarius*.

Au vu des résultats, un système ayant pour phase mobile: isopropanol/ acétate d'éthyle/ eau, dans les proportions 6/3/1, est testé, en gardant les mêmes conditions, à savoir l'hydrolyse des polysaccharides par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C, durant 5 heures.



Ara Gal Glc Man Xyl Glc. A M A Z R P

Figure 20- Caractérisation par CCM des hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de différentes plantes spontanées à caractère médicinal par l'acide trifluoroacétique, 4 M à 80°C durant 5 heures (M*: M. parviflora*, A: *A.* tenuifolius, R: *R. vesicarius*, Z: *Z. lotus* et P: *P. notata*)

Figure 20, laisse remarques l'apparition de 5 taches pour les hydrolysats d'extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles de *Malva parviflora* et d'*Asphodelus tenuipholius* au lieu de 8 taches pour *Malva parviflora* et 9 taches pour *Asphodelus tenuipholius* (Fig. 14). De même, 6 taches sont notées pour *Zizyphus lotus* au lieu de 7 taches (Fig. 20). Toutefois, le nombre de tache reste inchangé pour les hydrolysats d'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Plantago notata* et de *Rumex vesicarius*

(Fig. 20). Il se remarque un R_f faible pour l'acide glucuronique soit 0.02. Ce second système, présente l'avantage d'augmenter la résolution de certaines taches. Il se traduit par l'augmentation de l'écart entre les R_f des taches (Fig. 20). La tache signalant le galactose dans tous les hydrolysats, semble plus nette. Mais la similitude des R_f de l'arabinose et de mannose soit 0.41, obscurcie l'identité de la tache. L'utilisation de réactif de Nigrum comme révélateur permet de donner des couleurs différentes en contact avec les pentoses et les hexoses (DI et *al.*, 2003), ce qui permet de faciliter la distinction entre l'arabinose et le mannose.

La détermination de la composition en oses constitutifs des différents extraits de polysaccharides hydrosolubles feuilles de *Malva parviflora*, *Asphodelus tenuifolius*, *Zizyphus lotus*, *Rumex vesicarius* et *Plantago notata* par CCM indique, une hétérogénicité et une diversité des oses neutres et acides, pentoses et hexoses. Tous les extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des plantes échantillonnées, renferment des hétéropolysaccharides acides. Les polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* sont constitués d'arabinose, de galactose, d'acide glucuronique et soit de glucose ou de mannose. Celles d'*Asphodelus tenuifolius* contiennent d'arabinose, de glucose, de xylose, d'acide glucuronique et probablement de galactose et de mannose. Les polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus lotus* sont constitués d'arabinose, de galactose, de glucose et d'acide glucuronique. Celles de *Plantago notata* et *Rumex vesicarius* renferment surtout d'arabinose, du glucose, d'acide glucuronique et probablement de galactose (Tab. 3).

Tableau 3- Composition en monosaccharides des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de différentes plantes échantillonnées, dans les 2 systèmes de phase mobile 1 et 2 en CCM (M*: M. parviflora*, A: *A. tenuifolius*, R: *R. vesicarius*, Z: *Z. lotus* et P: *P. notata*)

	Système 1						Système 2					
Type	Ara	Gal	Glc	Man	Xyl	Glc.A	Ara	Gal	Glc	Man	Xyl	Glc.A
M	x	x		x		x	x	x	x			x
A	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x
Z	x	x	x			x	x	x	x			x
R	x		x			x	x	x	x			x
P	x		x			x	x	x	x			x

Ainsi d'autres taches représentent la même valeur ou proche de R_f comme: 0.12, 0.61 dans tous les extraits et 0.17 de certains extraits (*Malva parviflora*, *Rumex vesicarius* et *Plantago notata*) dans les chromatogrammes du premier système. Ces taches semblent être des oses hors de la gamme étalon utilisée, qui constitue d'arabinose, de galactose, de glucose, de mannose, de xylose, et d'acide glucuronique.

3.2.3.- Détermination de la composition en oses constitutifs par HPAEC-PAD

Pour compléter les données et pour confirmer la composition en oses constitutifs des différents hydrolysats des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles des différentes échantillons de plantes étudiées, il est fait appel à la chromatographie échangeuse d'anions de haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD).

Les figures 22, 23 et 24 représentent les chromatogrammes des oses constitutifs de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *M. parviflora*, *A. tenuipholius*, et *Z. lotus* respectivement. La figure 21 regroupe les résultats d'analyse par HPAEC-PAD des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *M. parviflora*, d'*A. tenuifolius*, et de *Z. lotus*. Il apparaît que l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de *Malva parviflora*, est constitué principalement de 56,86% galactose, 8,46% de rhamnose, 9,04% d'arabinose, 5,05% de mannose, et 20,57% d'acide glucuronique. Le rapport des pourcentages des oses constitutifs principaux de *M. parviflora* pour Gal /Rha est de 6,72, Ara /Rha de 1,06, Glc.A /Rha 2,43; donc on peut l'exprimer par Gal /Glc.A /Ara /Rha, soit 6,72 /2,43 /1,06 /1. De même, le profil d'*A. tenuifolius* montre une prédominance de mannose à 39,25% et de glucose à 31,55%, suivie de 10,92% de l'acide glucuronique et 8,9% d'arabinose. Le rhamnose et le xylose sont présentés en faible pourcentage avec 5,22% et 4,14% respectivement. Le rapport des pourcentages des oses majeurs d'*A. tenuifolius* pour Man /Ara est de 4,40, Glc /Ara de 3,54, Glc.A / Ara de 1,22, donc on peut l'exprimer par Man /Glc /Glc.A /Ara, soit 4,40 /3,54 /1,22 /1,0. Les polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Z. lotus* sont constitués majoritairement 30,74% de galactose, 27,34% de glucose, 26,03% de rhamnose, 12,25% d'arabinose et un faible pourcentage d'acide glucuronique soit 3,62%. Le rapport des pourcentages des oses majeurs de *Z. lotus* de Gal / Ara est de 2,50, Glc /Ara de 2,23, Rha /Ara de 2,12, ceci donne Gal /Glc /Rha /Ara, avec 2,50 /2,23 /2,12 /1,0. TOMODA et *al.* (1989), rapportent comme pourcentage d'oses simples de l'extrait de polysaccharides de feuilles de *Malva sylvestris* (Malvaceae), 40,2% de rhamnose, 22,2% de galactose, 16,0% d'acide galacturonique et 16,0% d'acide glucuronique.

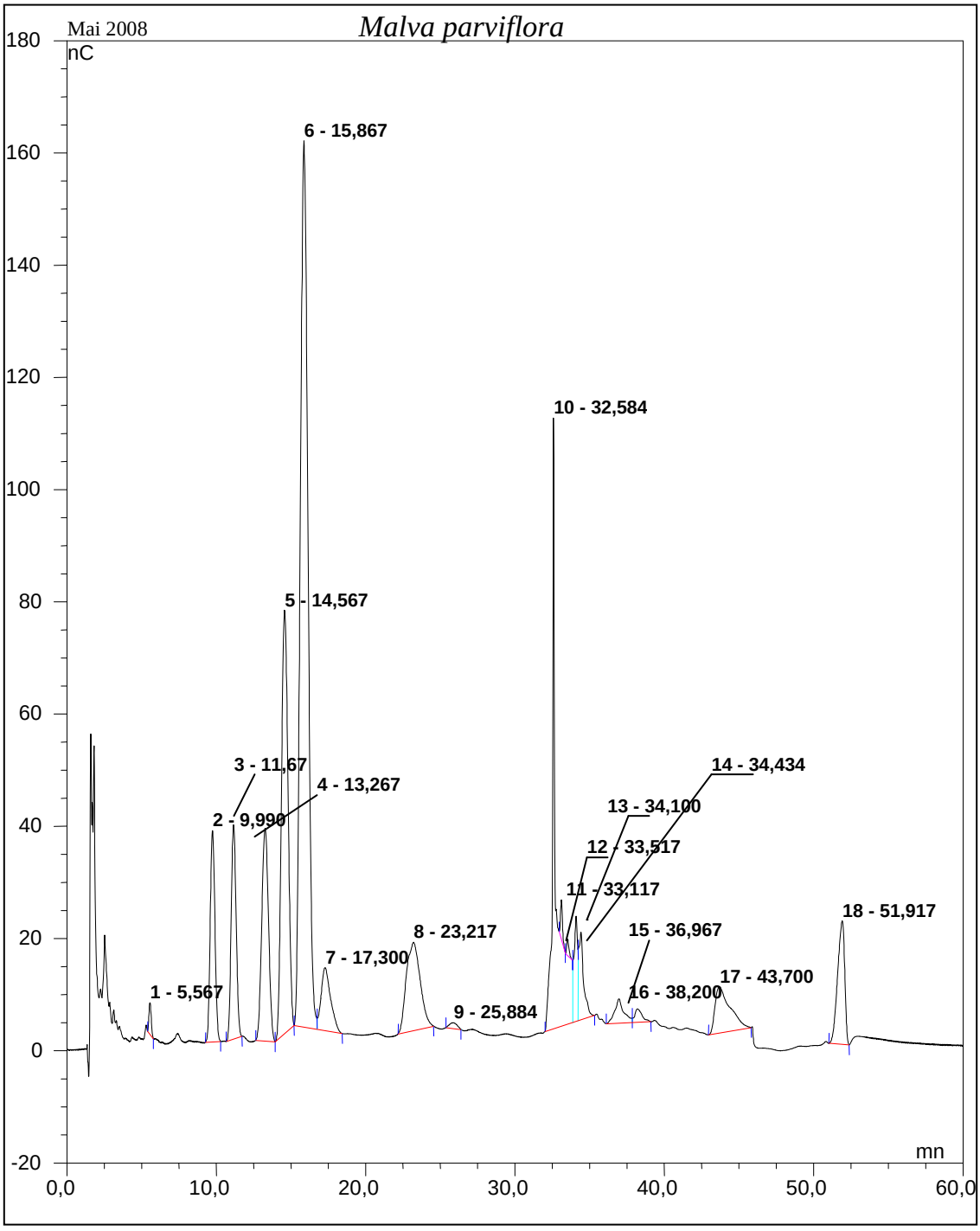


Figure 21- Chromatogramme de l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles extrait des feuilles de *Malva parviflora*, par HPAEC-PAD

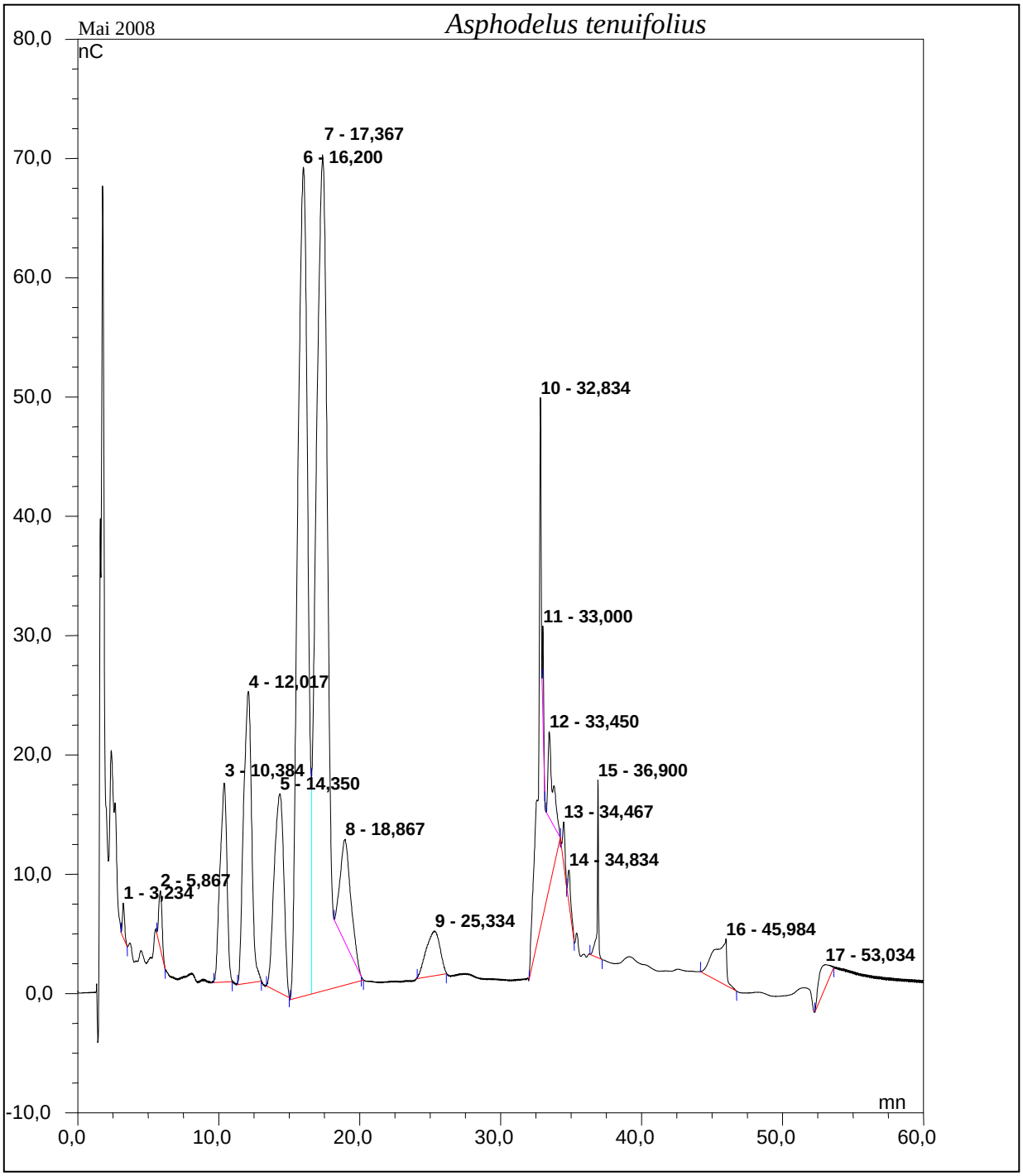


Figure 22- Chromatogramme de l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles extrait des feuilles d'*Asphodelus tenuifolius*, par HPAEC-PAD

Zizyphus lotus

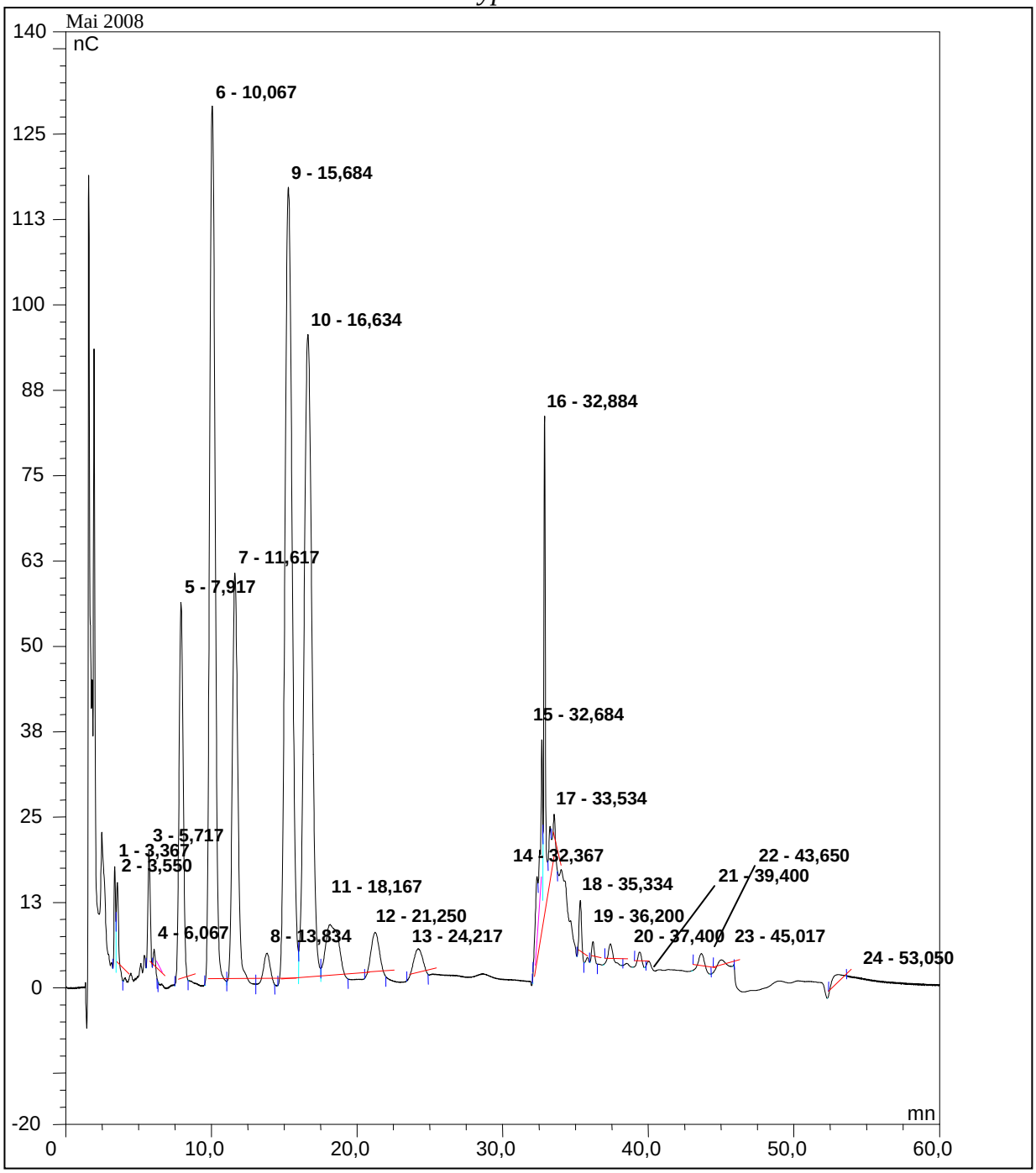


Figure 23- Chromatogramme de l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles extrait de des feuilles de *Zizyphus lotus* effectué, par HPAEC-PAD

De même, en plus du glucose dans l'étude d'ATKHAMOVA et *al.* (1997) sur les polysaccharides hydrosolubles d'extrait des feuilles de *Malva mavritana* (Malvaceae). Il a signalé 10% de rhamnose, 5% d'arabinose, 7,5% de galactose, 1,5% de mannose, 1% de glucose et 27% d'acide uronique. Les polysaccharides des Malvaceae présentent une chaîne Rhamnogalacturonique et des ramifications par des acides uroniques et du galactose (TOMODA et *al.*, 1989). L'analyse des pourcentages des oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* montre des valeurs très proches de celles de la gomme arabique soit 32% de galactose, 17-34% d'arabinose, 19% d'acide glucuronique et 11% de rhamnose selon AL-ASSAF et *al.* (2007).

Des études sur des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Aloe barbadensis* (Liliaceae) effectué par FEMENIA et *al.* (1999) rapportent des pourcentages de mannose et de glucose, de l'ordre de 75% des oses totaux, de même la présence de rhamnose, d'arabinose et une large gamme des acides uroniques (Fig. 24 annexe 4), laissent supposer l'existence des pectines. Le faible pourcentage de xylose, semble venir des hémicelluloses (FEMENIA et *al.*, 1999). L'étude de BUCKERIDGE et *al.* (2000), montre la présence de polymère de type Glucomannane dans plusieurs espèces de la famille de Liliaceae telles que *Asparagus officinalis*, *Edymion mutans* et *Scilla nonscripta.* Le fort pourcentage de glucose et de mannose, montre la présence de polysaccharide de type Glucomannane dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Asphodelus tenuipholius*. Parallèlement, les polysaccharides extraits des feuilles de *Zizyphus mauritiana* (Rhamnaceae), renferment de glucose à 25,98%, de rhamnose à 24,98%, 9,29% d'arabinose et de galactose 8,88 %, alors qu'il est noté 21,30% de glucose, 20,28 % de rhamnose, 9,55% d'arabinose et 23,95% de galactose chez *Zizyphus lotus* (Fig. 21).

Néanmoins, il se peut tout à fait que certains des pics sur les échantillons soient non identifiés (Fig. 22, 23 et 24). Ils représentent des sucres non présents dans le standard. Les profils sont très intéressants car ils montrent une grande hétérogénéité de sucres et probablement des désoxyoses et des pentoses.

3.3.- Effets biologiques des oligosaccharides issus des extraits polysaccharidiques sur *Klebsiella pneumonea pneumonea*

Au vu des résultats de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 2 M, il est apparu opportun d'évaluer l'activité des oligosaccharides des différents extraits, sur la multiplication de la souche sélectionnée *Klebsiella pneumonea pneumonea*. L'effet de

l'addition d'oligosaccharides dans le milieu de culture de la souche, est quantifié en suivant la croissance du microorganisme, estimée par mesure de l'absorbance à 620 nm.

Les hydrolysats partiels des extraits de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Malva parviflora*, *Asphodelus tenuifolius*, *Zizyphus lotus*, *Rumex vesicarius* et *Plantago notata* dans une moindre mesure, engendrent une amélioration de la croissance de *Klebsiella pneumonea pneumonea* comparativement aux témoins (milieu de culture sans addition d'oligosaccharides) (Fig. 25). Toutefois, l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration d'hydrolysat est différente selon la source. Pour les hydrolysats partiels de *Malva parviflora*, d'*Asphodelus tenuifolius*, et de *Plantago notata*, montrent une croissance fluctuante, pour les faibles concentrations et n'est effective qu'à partir de 0,166 mg/ml pour l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles de *Malva parviflora.* Cependant, la croissance reste faible même à concentration de 0,333 mg/ml pour l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles d'*Asphodelus tenuipholius*, dont la différence des absorbances des milieux de culture additionné d'oligosaccharides issus d'*Asphodelus tenuipholius* et l'absorbance de milieu de culture négatif (étalon) n'a pas dépassé le 0,1 DO. Les valeurs supérieures de 0,1 DO sont considérées à effet prébiotique selon GENESTIE (2006) et encore plus stable pour l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* (Fig. 25). Les fluctuations à des faibles concentrations de la multiplication dans les milieux de culture contenant des hydrolysats partiels des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora*, *Asphodelus tenuipholius*, et *Plantago notata,* révèlent les perturbations métaboliques consécutives au changement de source carbonée (LAMBIN et GERMAN, 1969). L'augmentation de la concentration bactérienne pour l'hydrolysat partiel de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Malva parviflora*, semble due à l'effet des oligosaccharides, ce qui reflète leur fermentation (DELATTRE, 2005). Au regard des hydrolysats partiels de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Zizyphus lotus* et de *Rumex vesicarius*, il est noté une augmentation de la population bactérienne plus précoce dès à la concentration 0,02 mg/ml. Cela peut être dû à la richesse des hydrolysats en oses simples, facilement assimilable par les microorganismes (MARCHAL et *al.* 1987). Pour l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles de *Rumex vesicarius*, la concentration bactérienne évolue très faiblement avec l'augmentation de la concentration d'hydrolysat.

Tandis que pour l'hydrolysat partiel de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus lotus*, il se marque des absorbances très significatives, se traduisant par un effet prébiotique. GENESTIE (2006) attribue un caractère prébiotique à la préparation oligosaccharidique testée dès lors que celle-ci engendre un accroissement de 0,1 DO après 24 heures de culture, comparativement aux valeurs mesurées sur témoin négatif (milieu de culture sans addition d'oligosaccharides) pour certaines bactéries intestinales. Cela est remarqué seulement à 0,333 mg/ml avec *Malva parviflora* et *Zizyphus lotus*. En plus, le milieu de culture contenant d'hydrolysat partiel de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* est très efficace par rapport à ce de *Zizyphus lotus.* Ceci est dû probablement, d'après l'étude de la composition en oses constitutifs, à la présence des oses acides dans d'hydrolysat partiel de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Zizyphus lotus* qui sont dégradés faiblement par l'équipement enzymatique de la bactérie (GENESTIE, 2006). Ces résultats montrent combien, il est important d'établir une caractérisation approfondie des mélanges d'oligosaccharidiques, avant d'en évaluer les potentialités prébiotiques. La stabilité des absorbances à 620 nm dans les milieux de culture additionnée d'hydrolysats partiels des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Rumex vesicarius* et *Plantago notata*, peut traduire une atteinte de la phase stationnaire plus précoce. Des mesures complémentaires de la concentration bactérienne au-delà de 24 heures seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Après 48 heures de culture de *Klebsiella pneumonea pneumonea*, continue de croître. Les hydrolysats partiels des extraits de polysaccharides hydrosolubles stimulent de manière significative la croissance de *Klebsiella pneumonea pneumonea*. En effet, l'augmentation des absorbances après 48 heures de culture sont supérieures d'environ 0,16 unité pour le milieu de culture supplémenté par l'hydrolysat partiel de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Rumex vesicarius* et 0,16 unité pour le milieu de culture supplémenté par l'hydrolysat partiel de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Plantago notata*, à celles mesurées pour 24 heures. Cet accroissement des absorbances infirme l'atteinte de la phase stationnaire pour les milieux de culture supplémentés par l'hydrolysat partiel de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Rumex vesicarius* et de de *Plantago notata* (Fig. 26).

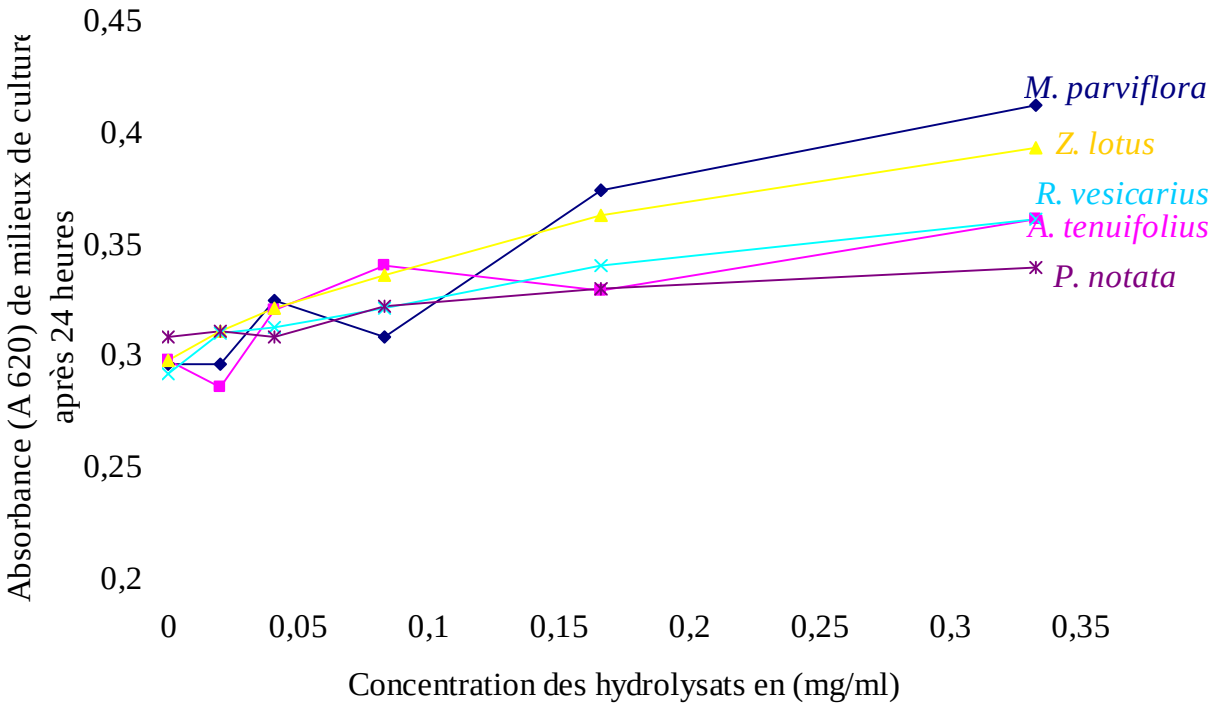


Figure 25- Croissances de *Klebsiella pneumonea pneumonea* après 24 heures en milieu de culture supplémenté par différentes sources d'oligosaccharides à différentes concentrations, estimé par mesure des absorbances à 620 nm

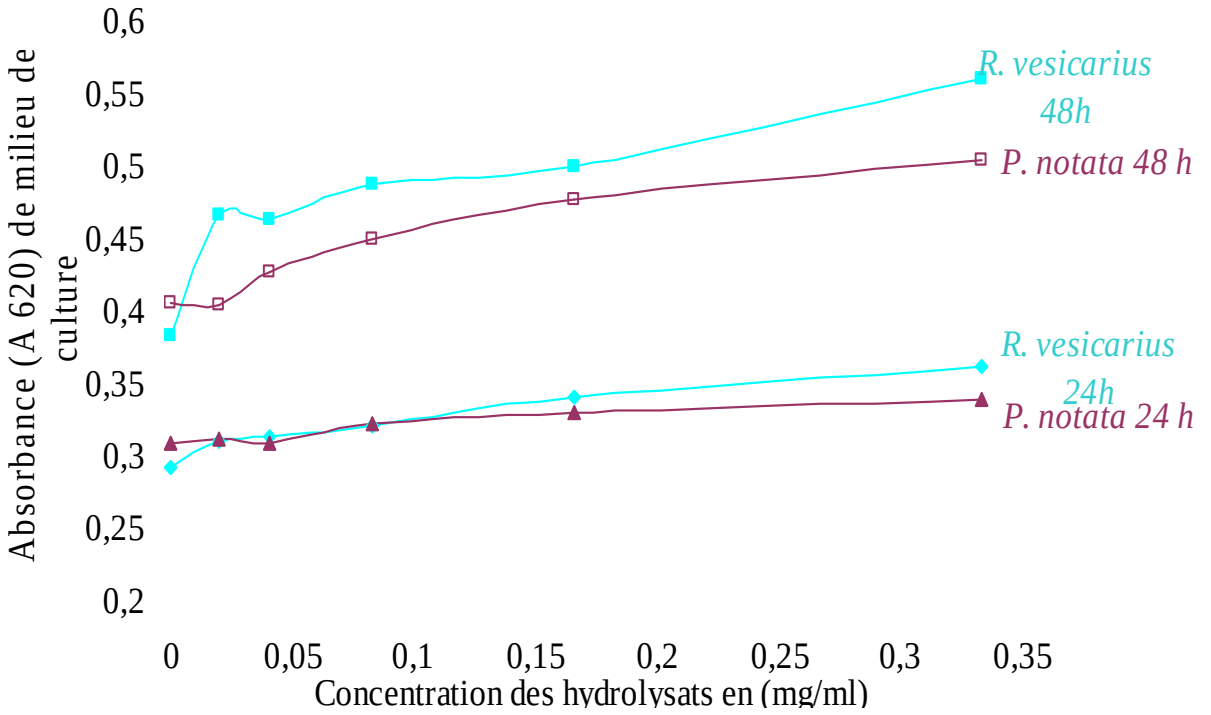


Figure 26- Croissance de *Klebsiella pneumonea pneumonea* après 24, 48 heures de culture supplémentée par les hydrolysats partiels de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *R. vesicarius* et de *P. notata* exprimée en absorbance mesurée à 620 nm

Conclusion

L’étude des polysaccharides hydrosolubles à partir des feuilles des plantes spontanées, à caractère médicinal de *Malva parviflora* (Malvaceae), *Asphodelus tenuipholius* (Liliaceae), *Zizyphus lotus* (Rhamnaceae), *Rumex vesicarius* (Polygonaceae), et *Plantago notata* (Plantaginaceae), après élimination des extraits éthanoliques, débute par une extraction à l'eau distillée, à la température ambiante pendant 24 heures. Puis la précipitation des polysaccharides se fait à l’éthanol à 75%. Le rendement massique des extraits polysaccharidiques diffère d'une plante à une autre, mais reste toujours inférieur de 2%. L'étude de la composition des différents extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles après lyophilisation, donne des valeurs moyennes de 16,97 ± 4,8 % d'humidité, 25,99 ± 15,29% de cendres totales, 26,3 ± 2,97% de protéines totales et 28,79 ± 10,18% d'oses totaux. Parmi les oses, 60,13 ± 8,34% sont des oses neutres et 39,87 ± 3,62% sont des oses acides. Toutefois, les valeurs de l'humidité qui semblent élevées, résultent de l'effet hygroscopique des polysaccharides après lyophilisation, d’où la nécessité d'avoir des techniques de conservation plus adéquates. Les teneurs en cendres des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles représentent le 1/4 de la composition totale, et sont en relation avec celles de la plante, d’origine en cendres. Les protéines restent le deuxième constituant majeur dans les extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles, par leur co-précipitation avec les polysaccharides par l'éthanol.

L'optimisation de l'hydrolyse des polysaccharides, a nécessité la mise en oeuvre de 8 essais d’hydrolyse sur CCM. L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique, durant 5 heures à 80°C semble donner les meilleurs résultats.

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) de la composition en oses des polysaccharides hydrosolubles extraits des feuilles des plantes spontanées, à caractère médicinal (*M. parviflora*, *A. tenuifolius*, *R. vesicarius*, *Z. lotus* et *P. notata*) montre une hétérogénéité et une diversité des oses; neutres et acides, pentoses et hexoses. Les polysaccharides hydrosolubles issus des feuilles de *Rumex vesicarius* et de *Plantago notata* sont constitués principalement d'arabinose, de glucose et d'acide glucuronique.

L'analyse par chromatographie échangeuse d'anions, de haute performance à détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC-PAD) de la composition en oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles, issus des feuilles de *Malva parviflora*, *Asphodelus tenuifolius,* et *Zizyphus lotus* est entreprise pour une confirmation de la CCM.

Les polysaccharides hydrosolubles issus des feuilles de *Malva parviflora*, renferment 56.86% de galactose, 20.57% d'acide glucuronique, 9,04% d'arabinose, 8,46% de rhamnose et 5,05% de mannose. Les polysaccharides hydrosolubles issus des feuilles d'*Asphodelus tenuifolius* montrent une prédominance prédominance de mannose à 39,25% et de glucose à 31,55%, suivie de 10,92% de l'acide glucuronique et 8,9% d'arabinose. Le rhamnose et le xylose sont présentés en faible pourcentage avec 5,22% et 4,14% respectivement. Le fort pourcentage de glucose et de mannose laisse supposer la présence de polysaccharides, de type Glucomannane. Parallèlement, les polysaccharides hydrosolubles issus des feuilles de *Zizyphus lotus* se constituent majoritairement de 30,74% de galactose, 27,34% de glucose, 26,03% de rhamnose, 12,25% d'arabinose et un faible pourcentage d'acide glucuronique soit 3,62%.

L'action à stimuler la croissance d'une bactérie, des hydrolysats partiels des extraits de polysaccharides hydrosolubles, est testée sur la souche *Klebsiella pneumonea pneumonea*, représentant la flore intestinale banale. Les hydrolysats partiels des extraits de polysaccharides hydrosolubles issus des feuilles de *Malva parviflora* et *Zizyphus lotus*, à concentration de 0,333 mg/ml stimulent de manière significative à 0,1 DO après 24 heures; la croissance de *Klebsiella pneumonea pneumonea.* L'action prébiotique des oligosaccharides issus des hydrolysats partiels des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* et *Zizyphus lotus* sur cette souche est appréciable.

Perspectives

Il est souhaitable, pour augmenter le rendement d'extraction des polysaccharides par plante, d'agir au cours de la macération sur la température, le temps d'extraction, le type et le pourcentage d'alcool-eau ajouté au cours de la précipitation des polysaccharides. Une utilisation des techniques de purification des polysaccharides pour l'étude de leurs propriétés rhéologique, demeure en suspens à l'issue de ce travail. De même; l'analyse par HPAEC-PAD reste à suivre pour *Rumex vesicarius* et *Plantago notata*;

La caractérisation des oligosaccharides issus des hydrolysats partiels des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* et *Zizyphus lotus*, et leur capacité à induire la production d'acides gras à courte chaîne, sur *Klebsiella pneumonea pneumonea* est à poursuivre.

Références bibliographiques

1. ABDEL-RAHMAN E. A., SMEJKAL Q., SCHICK R., EL-SYIAD S. et KURZ T., 2008- Influence of dextran concentrations and molecular fractions on the rate of sucrose crystallization in pure sucrose solutions. Journal of food engineering, vol. 84: 501–508.
2. AL ASSAF S., PHILLIPS G. O. et WILLIAMS P. A., 2007-Studies on acacia exudate gums. Part I: the molecular weight of Acacia senegal gum exudates. Food hydrocolloids, vol. 19: 647-660.
3. ALAIS C. et LINDEN G., 1997- Biochimie alimentaire. Ed. Masson, Paris: 20-54.
4. ALFAWAZ M. A., 2006- Chemical composition of hummayd (*Rumex vesicarius*) grown in saudi arabia. Journal of food composition and analysis, vol. 19: 552–555.
5. ALLIIET J. et LALEGERIE P., 1997- Cytobiologie. Ed. Ellipses, Paris: 675.
6. AMUTI K S. et POLLARD C. J., 1977- Soluble carbohydrates of dry and developing seeds. Phytochemistry, vol. 16: 529-532.
7. ATKHAMOVA S. K., RAKHIMOV D. A., KRISTALLOVIEH E. L., KARIMDZHANOV A. K., et ISMAILOV A. I., 1997- PLANT POLYSACCHARIDES.VI. POLYSACCHARIDES OF REPRESENTATIVES OF THE MALVACEAE FAMILY. Chemistry of Natural Compounds, vol. 33: 590- 593.
8. AUDIBERT G., CHARPENTIER C., SAVOYE E. et LAXENAIRE M. C., 1995- Evolution de la consommation d'albumine et des substituts colloïdaux du plasma de 1989 à 1993 dans un centre hospitalier universitaire français. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation, vol. 14: 517-522.
9. AUDIGIE C., FIGARELLA J. et ZONSZAIN F., 1984- Manipulations d'analyse biochimique. Ed. doin, Paris: 3-4.
10. AUTRAN J. C., 1991- Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed. Tec et Doc, Paris: 115-137.
11. BATTANDIER A., 1882-Le droguier d'un mozabite. Imprimés de bibliothèque nationale de la république française, Paris: 3-12.
12. BERCHE P., GAILLARD J. L., SIMONET M., 1988- Bactériologie. Flammarion, Paris: 595-599.
13. BERTRAND D. et DUFOUR E., 1987- La spectroscopie Infrarouge et ses applications analytiques. Ed. Tec et doc, Paris: 55-193.
14. BIRINGANINE G., VRAY B., VERCRUYSSE V., VANHAELEN-FASTRE R., VANHAELEN M. et DUEZ P., 2004- Polysaccharides extracted from the leaves of *Plantago palmata* Hook induce nitric oxide and tumor necrosis factor-α production by interferon-γ-activated macrophages. Nitric oxide, vol. 12: 1-8.

15. BLANLOEIL Y., TROSSAERT M., RIGAL J. C. et ROZEC B., 2002- Effets des solutés de remplissage vasculaire sur l'hémostase. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation, vol. 21: 648–667.
16. BLUMENKRANTZ N. et ASBOE-HANSEN G., 1973- New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical biochemistry, vol. 54: 484-489.
17. BORNET F. J., BROUNS F., TASHIRO Y. et DUVILLIER V., 2002- Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. Digest liverdis, vol. 34: 11-20.
18. BRENNAN C. S., BLAKE D. E., ELLIS P. R. et SCHOFIELD J. D., 1996- Effects of guar galactomannan on wheat bread microstructure and on the in vitro and in vivo digestibility of starch in bread. Journal of cereal science, vol. 24: 151-160.
19. BRUNETON J., 1999- Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec et Doc, Paris: 3-119.
20. BUCKERIDGE M., SANTOS H. P., TINE M. A., 2000- Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seeds. Plant physiology, Biochemical, vol. 38: 141−156.
21. COATS T. J. et HERON M., 2004- The effect of hypertonic saline dextran on whole blood coagulation. Resuscitation, vol. 60: 101-104.
22. CUNHA P. L. R., DE PAULA R. C. M. et FEITOSA J. P. A., 2007- Purification of guar gum for biological applications. International journal of biological macromolecules, vol. 41: 324-331.
23. D.P.A.T, Données géographiques de Ghardaïa. D.P.A.T, Ghardaïa, 2007, 1p.
24. DELATTRE C., 2005- Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes. Thèse de doctorat de l'université de Picardie jules verne, Valois Santerre: 5-10.
25. DETERS A.. M., LENGSFELD C. et HENSEL A. 2005- Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro. Journal of Ethnopharmacology , vol. 102:391–399.
26. DI X., CHAN K. K. C., LEUNG H. W., HUIE C. W. 2003- Fingerprint profiling of acid hydrolyzates of polysaccharides extracted from the fruiting bodies and spores of Lingzhi by high-performance thin-layer chromatography. Journal of chromatography a, vol. 1018: 85–95.
27. DIALLO D., SANOGO R., YASAMBOU H., TRAORE A., COULIBALY K. et MAIGA A., 2004- Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana*

Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. Chimie, vol. 7: 1073–1080.

28. DOAT J., 1974- Application de la chromatographie sur couche mince à l'analyse des gommes et des bois tropicaux. Revue bois et forêts tropiques, vol. 156: 63-74.
29. EBRINGEROVA A., KARDOSOVA A., HROMADKOVA Z. et HRIBALOVA V., 2003- Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. Fitoterapia, vol. 74: 52–61.
30. FEMENIA A., SANCHEZ E. S., SIMAL S. et ROSSELLO C., 1999- Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. Carbohydrate polymers, vol. 39: 109–117.
31. FISCHER M., YU N., GRAY G. R., RALPH J., ANDERSOND L. et MARLETTA J. A., 2004- The gel-forming polysaccharide of psyllium husk (*Plantago ovata* Forsk). Carbohydrate research, vol. 339: 2009–2017.
32. GARRIDO. F., MICHEL. C. et MORIN. D., 2002- Les exopolymères bactériens; (synthèse bibliographique). Bureau de recherche géologiques et minières, brgm /rp-51637**:** 01-39.
33. GENESTIE B., 2006- Optimisation de la production d'arabinoxylo-oligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales: approches méthodologiques. Thèse de doctorat de l'université de Limoges: 30-50.
34. GUIGNARD J. L., 1996- Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris: 95-152.
35. GUO Q., CUI S.W., WANG Q. et YOUNG J.C., 2007- Fractionation and Physicochemical Characterization of Psyllium Gum. Carbohydrate Polymers, vol. 3614:11-37.
36. HAMMICHE H. et MAIZA K., 2006- Traditional medicine in central sahara: pharmacopoeia of tassili n'ajjer. Journal of ethnopharmacology, vol. 105: 358-367.
37. KAMERLING L., BOONS G. L., LEE Y. C., SUZUKI A., TANIGUCHI N. et VORAGEN A., 2007- Comprehensive glycoscience. Ed. Elsevier, vol. 2, Paris: 654-681.
38. KARDOSOVA A. et MACHOVA E., 2006- Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. Fitoterapia, vol. 77: 367–373.
39. KATSURAYA K., OKUYAMA K., HATANAKA K., OSHIMA R., SATO T. et MATSUZAKI K., 2003- Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ^{13}C NMR spectroscopy. Carbohydrate polymers, vol. 53: 183-189.
40. KIOSSEOGLOU A., PAPALAMPROU E., MAKRI E., DOXASTAKIS G. et KIOSSEOGLOU V., 2003- Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by Xanthomonas Campestris ATCC 1395 in batch culture. Food research international, vol. 36: 425-430.

41. KOBATA A., 2000- A journey to the world of glycobiology. Glycoconjugate journal, vol.17: 443-464.
42. KUNZ C. et RUDLOFF S., 2006- Health promoting aspects of milk oligosaccharides. International dairy journal, vol. 16: 1341–1346.
43. LAMBIN S. et GERMAN A., 1969- Précis de microbiologie. Ed. Masson et c^{ie}, Paris: 515 p.
44. LE CERF D., IRINEI F. et MULLER G., 1990- Solution properties of gum exudates from Sterculia urens (Karaya gum). Carbohydrate polymers, vol. 13: 375-386.
45. LE LUBRE M., 1952- Conditions structurales et formes de relief dans le Sahara. T. VIII, inst. rech. saha., Alger: 189 -190.
46. LI J. W., DING S. D., DING X. L., 2007a. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv Jinsixiaozao. Journal of food engineering, vol. 80: 176–183.
47. LI S., ZHANG Y., ZHAO J., 2007b- Preparation and suppressive effect of Astragalus polysaccharidein glomerulonephritis rats. International Immunopharmacology, vol. 7: 23–28.
48. LINDEN G. et LORIENT D., 1994- Biochimie agro-industrielle. Ed. Masson, Paris: 243-246.
49. LIU H., HUANG C., DONG W., DU Y., BAI X. et LI X., 2005- Biodegradation of xanthan by newly isolated Cellulomonas sp. LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons. Process biochemistry, vol. 40: 3701-3706.
50. MAIZA K., BRAC DE LA PERRIERE R. A., HAMMICHE V., 1993- Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. Medicaments et aliments: l'approche ethnopharmacologique: 169-171.
51. MARCHAL N., BOURDON J. L., RICHARD Cl., 1987- Les milieux de culture. Ed. Doin, Paris: 36 p.
52. MARTINEZ-FEREZ A., RUDLOFFB S., GUADIX A., HENKEL C. A., POHLENTZ G., BOZA J. J., GUADIX E. M. et KUNZ C., 2006- Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. International dairy journal, vol. 16: 173–181.
53. MARVELYS L., MARITZA M., LILIAN S., DE PINTO GLADYS L. et JULIO H., 2006- Structural elucidation of the polysaccharide from Sterculia apetala gum by a combination of chemical methods and NMR spectroscopy. Food hydrocolloids, vol. 20: 908-913.

54. MATTHEWS M. L. et ENDRESS P. K., 2006- Floral structure and systematics in four orders of rosids, including a broad survey of floral mucilage cells. Plant systematic and evolution, vol. 260: 199–221.
55. MILES W., MEMBER N. et MORRIS E. R., 1995- Solubility, solution rheology and salt-induced gelation of welan polysaccharide in organic solvents. Carbohydrate polymers, vol. 27: 23-36.
56. MOHAMMADIFAR M. A., MUSAVI S. M., KIUMARSI A. et WILLIAMS P. A., 2006- Solution properties of targacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from Astragalus gossypinus). International journal of biological macromolecules, vol. 38: 31-39.
57. MONSIGNY M., PETIT C. et ROCHE A. C., 1988- Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acids micromethod. Analytical biochemistry, vol. 175: 525-530.
58. MOTLAGH S., RAVINES P., KARAMALLAH K. A. et MA Q., 2006- The analysis of Acacia gums using electrophoresis. Food hydrocolloids, vol. 20: 848-854.
59. MURRAY R., GRANNER D., MAYES P et RODWELL V., 1999- Biochimie. Ed. McGraw-Hill, Italie: 641 p.
60. NAKAJIMA K., KINOSHITA M., MATSUSHITA N. et URASHIMA T., 2006- Capillary affinity electrophoresis using lectins for the analysis of milk oligosaccharide structure and its application to bovine colostrum oligosaccharides. Analytical biochemistry, vol. 348: 105–114.
61. NISHINARI K. et TAKAHASHI R., 2003- Interaction in polysaccharide solutions and gels. Current opinion in colloid and interface science, vol. 8: 396-400.
62. NYAME A. K., KAWAR Z. S. et CUMMINGS R. D., 2004- Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. Archives of biochemistry and biophysics, vol. 426:182–200.
63. O.N.M., (2005): Données climatiques de Ghardaïa. O.N.M., Ghardaïa, 3 p.
64. OZENDA P., 1983- Flore du sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 617 p.
65. OULD EL HADJ M. D., HADJ- MAHAMMED M., ZABEIRROU H., et CHEHMA A., 2003- Importance des plantes spontanées médicinales dans la pharmacopée traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional Est algérien). Annales de l'INRAT, vol. 76: 225-240.
66. PARIS M. et HURABIELLE M., 1981- Matière médicale (pharmacognosie). Ed. Masson, T. 1, Paris: 26-67.

67. PAULSEN B. S., OLAFSDOTTIR E. S., et INGOLFSDOTTIR K., 2002- Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. Journal of chromatography a, vol. 967: 163–171.
68. PIKULSKI M., HARGROVE A., SHABBIR S. H., ANSLYN E. V., et BRODBELT J. S., 2007- Sequencing and characterization of oligosaccharides using infrared multiphoton dissociation and boronic acid derivatization in a quadrupole ion trap. American society for mass spectrometry, vol. 18: 2094–2106.
69. PRAT R., MOSINIAK M. et ROLAND J. C., 2002- Physilogie végétale. Biologie et multimédia, Université Pierre et Marie Curie, UFR de biologie: 984-988.
70. PSOMAS S. K., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M. et KYRIAKIDIS D. A., 2007-Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. Biochemical engineering journal, vol. 35: 273-280.
71. RANARIVELO Y., 2002- Cours de discipline universitaire à distance. Chimie des produits naturels. Faculté des sciences, université d'Antanarivo, Madagascar : 01-45.
72. RITSEMA T. et SMEEKENS S., 2003- Fructans: beneficial for plants and humans. Current opinion in plant biology, vol. 6: 223-230.
73. ROBIJN M., PLANKEN J., KORNELIS D., HOKKE C. H. et DEELDER A. M., 2007- Mass spectrometric detection of urinary oligosaccharides as markers of *Schistosoma mansoni* infection. The Netherlands transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, vol. 102: 79-83.
74. RUIZ G., 2005- Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat de l'université de Limoges: 36-38.
75. SAKSENA R., DEEPAK D., KHARE A., SAHAI R., TRIPATHI L. M. et SRIVASTAVA V. M. L., 1999- A novel pentasaccharide from immunostimulant oligosaccharide fraction of buffalo milk. Biochimica et biophysica acta, vol.1428: 433-445.
76. SAMUELSEN A. B., PAULSEN B. S., WOLD J. K., KNUTSEN S. H. et YAMADA H., 1998- Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major L.* Carbohydrate polymers, vol. 35: 145-153.
77. SEPULVEDA E., SAENZ C., ALIAGA E., et ACEITUNO C., 2007- Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. Journal of arid environments, vol. 68: 534–545.
78. SHIRANI G. et GANESHARANEE R., 2008-Extruded products with Fenugreek (Trigonella foenum-graecium) chickpeaand rice: Physical properties, sensory acceptability and glycaemic index. Journal of food engineering, vol. 89: 545-554.

79. SIMS I. M., 2003- Structural diversity of fructans from members of the order Asparagales in New Zealand. Phytochemistry, vol. 63: 351-359.
80. Singh B., 2007- Psyllium as therapeutic and drug delivery agent. International journal of pharmaceutics, vol. 334: 1-14.
81. TIKAROVSKA M. et CHMELIK J., 2004- Determination of neutral oligosaccharides in vegetables by matrix-assisted laser desorption /ionization mass spectrometry. Analytica chimica acta, vol. 520: 47-55.
82. TOMODA M., KANARI M., GONDA R. et SHIMIZU N. 1989- A Reticuloendothelial system-activating glycan from the seeds of *Malva verticillata*. Phytochemistry, vol. 28: 2609-2611.
83. TRABUT L., 1935- Flore du nord de l'Afrique (répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique. Latypolitho et Juies carbonel reunies, Alger: 37- 271.
84. VAN DEN ENDE W., DE CONINCK B. et VAN LAERE A., 2004- Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? Trends in plant science, vol. 9: 523-528.
85. VETVICKA V., VETVICKOVA J., FRANK J. et YVIN J. C., 2008- Enhancing effects of new biological response modifier β-1,3 glucan sulfate PS3 on immune reactions. Biomedicine and pharmacotherapy, vol. 62: 283-288.
86. VOGEL P., 2007- Glycobiologie et glycochimie: une introduction. Laboratoire de glycochimie et de synthèse asymétrique, école polytechnique fédérale de Lausanne: 01-89.
87. VOISIN A., 1987- Utilisation des plantes médicinales dans le souf au 19 ème siècle. Le sahara, 1er trimestre, vol. 100:25-28.
88. WACK M. et BLASCHEK W., 2006- Determination of the structure and degree of polymerisation of fructans from Echinacea purpurea roots. Carbohydrate research, vol. 341: 1147-1153.
89. WANG Q. et FANG Y., 2004- Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. Journal of Chromatography b, vol. 812: 309–324.
90. WARRAND J., 2004- Etude structurale et propriétés en solution des polysaccharides constitutifs de mucilage de lin (*Linum usitassimum*). Thèse de doctorat de l'université de Picardie jules verne, 238 p.
91. WEIL J.H., 2005- Biochimie générale. Ed. Dunod, Paris: 191-211.
92. WU Y., CUI S. W., TANG J., Wang Q. et GU X., 2007- Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. Carbohydrate polymers, vol. 70: 437–443.
93. XU X., XU J., ZHANG Y. et ZHANG L., 2008- Rheology of triple helical

Lentinan in solution: Steady shear viscosity and dynamic oscillatory behavior. Food hydrocolloids, vol. 22 :735-741.

94. YADAV M. P., IGARTUBURU J. M., YAN Y. et NOTHNAGEL E. A., 2007- Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. Food hydrocolloids, vol. 21: 297-308.
95. ZHANG L., LI X., XU X. et ZENG F., 2005- Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. Carbohydrate research, vol. 340: 1515-1521.
96. ZOHURIAAN M. J. et SHOKROLAHI F., 2004-Thermal studies on natural and modified gums. Polymer Testing, vol. 23: 575–579.

Annexes

Annexe 1

La teneur en matière sèche des feuilles dans les différentes plantes échantillonnées est décrite dans la méthode ci-dessous.

-Méthode de détermination de la teneur en matière sèche

- Sécher, à l'étuve un creuset en porcelaine à tarer à 103 ± 2°C jusqu'au poids constant, laisser refroidir au dessiccateur pendant 30 mn. Puis tarer le creuset. Soit G l'ensemble des masses marquées correspondant au premier équilibre;
- Placer dans le creuset 100 mg de feuilles. Peser l'ensemble (utiliser la même balance). Soit G_1 l'ensemble des masses marquées, correspondant au deuxième équilibre;
- Placer le creuset contenant la substance à analyser, dans l'étuve préalablement réglée à 103± 2°C;
- Faire le séchage jusqu'au poids constant. Soit G_2 l'ensemble des masses marquées correspondant au troisième équilibre (AUDIGIE et *al*., 1984).

Annexe 2

Les principaux constituants chimiques des extraits de polysacchrides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora, Asphodelus tenuifolius, Zizyphus lotus, Rumex vesicarius* et *Plantago notata* telles que la teneur en humidité, la teneur en cendres, le taux de protéines, la teneur en oses neutres et acides, sont déterminés par les méthodes décrites.

1.-Méthode de détermination de l'humidité

Sécher, à l'étuve, un creuset en porcelaine à tarer à 103 ± 2°C jusqu'au poids constant, laisser refroidir au dessiccateur pendant 30 mn. Puis tarer le creuset. Soit m_1 l'ensemble des masses marquées correspondant au premier équilibre. Placer dans le creuset 100 mg de lyophilisat. Peser l'ensemble (utiliser la même balance). Soit m_2 l'ensemble des masses marquées correspondant au deuxième équilibre. Placer le creuset contenant la substance à analyser, dans l'étuve préalablement réglée à 103 ± 2°C. Faire le séchage jusqu'au poids constant. Soit m_3 l'ensemble des masses marquées correspondant au troisième équilibre.

2.- Méthode de détermination de la teneur en cendres totale

- Mettre la prise d'essai (g) de 100 mg de chaque extrait brut dans des creusets en porcelaine préalablement séchés, soit G_1 le poids du creuset en porcelaine sec.
- Déterminer tous les poids à l'aide d'une même balance.
- Placer les creusets dans le four à moufle.
- Augmenter la température jusqu'à 600°C.
- Calciner à cette température jusqu'à l'apparition d'une coloration blanche ou grise.
- Refroidir les creusets en porcelaine avec la cendre dans un dessiccateur pendant 35 mn.
- Peser rapidement ces creusets en porcelaine sur la même balance, soit G le poids du creuset en porcelaine avec la cendre.

3.- Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

3.1.- Préparation des solutions

- Colorant

  Préparer une solution de 25 mg de Bleu de Coomassie dans 12,5 ml de méthanol;

  Additionner jusqu'à 25 ml d'acide phosphorique 85% (H_3PO_4**)**;

  Diluer avec l'eau distillée jusqu'à 50 ml.

  Le colorant est stocké à l'abri de la lumière et à 4°C.
- Réactif

  Ajouter 1 volume de colorant aux 4 volumes d'eau distillée.
- Préparer des solutions étalons 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml de sérum albumine bovine.

3.2.- Dosage

Dans des tubes en verre brûlés, à 1600 µl de solution à doser ou de l'étalon sont ajoutés 400 µl de réactif et bien agité. L'Absorbance est mesurée à 595 nm par le spectromètre Ultraviolet de type LNICAMYEAR, 2000. On soustrait le blanc (où l'échantillon est remplacé par 1600 µl d'eau distillée) de la lecture et on trace de la courbe

étalon en fonction de la concentration en sérum albumine bovine µg/ ml.

4.-Méthode de dosage colorimétrique des oses constitutifs : oses neutres et oses acides

4.1.- Préparation des solutions

- La solution de résorcinol est préparée à une concentration de 6 mg/ml d'eau bi distillée. Elle est maintenue à 4°C à l'abri de la lumière pour un délai d'utilisation maximum d'un mois. Quant à la solution d'H_2SO_4 80%, elle est préparée à partir d'H_2SO_4 concentré à 96% et, maintenue à l'abri de la lumière à température ambiante.
- La solution d'acide sulfurique/ tétraborate de sodium est préparée précautionneusement en ajoutant lentement et sous agitation magnétique, 0.12M de Borax (tétraborate de sodium) dans une solution d'H_2SO_4 96% refroidie entre 0 et 4°C dans un bain de glace. Elle est maintenue à 4°C à l'abri de la lumière.
- Solution de méta-hydroxydiphényl (MHDP) à 0.15 % dans NaOH 0.5 % (conservé à 4°C).
- Solutions étalons pour les oses neutres allant de 0 à 100 µg de L-arabinose.
- Solutions étalons pour les oses acides allant de 0 à 100 µg d'acide glucuronique.

4.2.- Dosage des oses neutres

- Déposer 400 µl solution à doser ou de l'étalon (le blanc est réalisé à l'eau bidistillée);
- Ajouter 400 µl de solution résorcinol (6 mg/ml d'eau bidistillée) ;
- Ajouter 2 ml d'H_2SO_4 à 80% ;
- Mettre les tubes à l'étuve à 90°C pendant 30 mn jusqu'à coloration (couleur jaune brun) ;
- Laisser refroidir à température ambiante pendant 30 mn à l'abri de la lumière et lire la densité optique (DO) à la longueur d'onde de 450 nm à la spectroscopie UV Visible.

4.3.- Dosage des acides uroniques

Dans des tubes en verre brûlés, à 400 µl de solution à doser ou de l'étalon sont

ajoutés 2.4 ml de solution sulfurique de tétraborate de sodium. Les tubes sont agités puis maintenus 20mn dans un bain-marie à 80°C. Après refroidissement dans un bain de glace, suivi de l'addition de 80 µl de solution de MHDP, les tubes sont agités puis laissés au repos 10 mn. L'absorbance de chacune des solutions est mesurée à 525 nm.

Annexe 3

Les spectres Infrarouges des extraits bruts de polysaccharides sont obtenu par un spectrophotomètre à transformé de Fourier selon le protocole décrit.

- Méthode de Spectrométrie Infrarouge

Les spectres Infrarouges à transformé de Fourier (FT-IR) de lyophilisats des extraits bruts de polysaccharides sont réalisés en pastilles de KBr. Une quantité de 0.5-1.0 mg d'échantillon est broyé avec 100 mg de KBr sec et compressé à 10000-15000 psi en pastilles de KBr (WU et *al.*, 2007). Tous les spectres Infrarouges ont été enregistrés entre 4000 et 400 cm^{-1}, sur un spectrophotomètre de type Testcan Shimadzu FTIR 8000 séries, possédant une résolution de 4 cm^{-1}(WU et *al.*, 2007).

Annexe 4

La détermination de la composition osidique des polysaccharides hydrosolubles issus des feuilles des plantes échantillonnées, est faite en procédant par hydrolyse selon le protocole.

1. Hydrolyse des liaisons glycosidiques

25 mg de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de chaque plante est hydrolysé, à 100°C pendant 5 heures, par 2 ml d'acide trifluoroacétique 2 M d'une part et 4 M d'autre part dans des tubes fermés à l'aide d'un bouchon à vis. Après refroidissement, l'hydrolysat est centrifugé à 2000 g pendant 5mn. Le surnageant est récupéré, puis l'acide est évaporé à l'aide d'un dessiccateur sous vide.

Une fois que l'hydrolyse est effectuée, les monosaccharides libérés sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM).

2. Chromatographie sur couche mince des résidus glycosidiques

2.1.-Préparation des solutions étalons

25 mg de chaque ose; galactose, arabinose, glucose, xylose, mannose, fructose et acide glucuronique est dissous dans 2,5 ml d'eau distillée.

2.2.- Types des plaques

On utilise des Plaques prêtes à l'emploi, de gel de silice (Silica gel 60 F254) de 0.25 mm d'épaisseur sur feuille d'aluminium ou de verre.

2.3.-Préparation des phases mobiles

- Butanol- Acide acétique- Eau dans les proportions de 2-1-1.
- Isopropanol- Acétate d'éthyle-Eau dans les proportions de 6-3-1.

2.4.-Préparation de révélateur (Réactif de NIGRUM) selon PAULSEN et *al.*, 2002

- Préparer deux solutions A et B:
  A; 4g de diphénylamine dans 100 ml d'acétone.
  B; 96 ml d'acétone complété jusqu'à 100 ml par l'aniline.
- Après mélangé les deux solutions A et B, on ajoute 20 ml d'acide orthophosphorique à 85%**.**

2.5.-Méthode

Dans un premier stade, on vérifie qualitativement la composition en oses des hydrolysats en déposant en parallèle, sur une même plaque, une série des étalons: arabinose, galactose, glucose, mannose, xylose, fructose et d'acide glucuronique ainsi que des solutions des hydrolysats. A 1,5 cm du bas de la plaque, on dépose à intervalles réguliers 10 ul de chaque solution correspondant à un poids de 100 ug d'ose, on introduit la plaque dans une cuve étanche dont l'atmosphère est saturée par le mélange de la phase mobile. Le développement du chromatogramme est effectué de façon ascendante jusqu'à le front. Après séchage, la révélation du chromatogramme est faite en pulvérisant sur la

plaque le Réactif de NIGRUM, et en séchant à l'étuve à 105°C pendant 10 à 15 mn (AUTRAN, 1991).

Annexe 5

La détermination de l'activité des hydrolysats des extraits des polysaccharides sur la souche *Klebsiella pneumonea pneumonea* est réalisée par la méthode suivante.

-Méthode de mesure de l'activité biologique

On distribue dans un premier temps, dans une série d'écouvillons stériles sur un volume de 1 ml de milieu de culture, des concentrations décroissantes de l'hydrolysat, en régression de 1/2. Puis on ajoute dans chaque écouvillon 1 ml de la suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 bactéries/ ml (BERCHE et *al*, 1988).

Résumés

RESUME

Les polysaccharides hydrosolubles des feuilles des plantes spontanées, à caractère médicinal dont *Malva parviflora* (Malvaceae), *Asphodelus tenuipholius* (Liliaceae), *Zizyphus lotus* (Rhamnaceae), *Rumex vesicarius* (Polygonaceae), et *Plantago notata* (Plantaginaceae), sont obtenus par extraction à l'eau distillée, à la température ambiante pendant 24 heures, après élimination des extraits éthanoliques; puis leur précipitation est faite par l'éthanol à 75%. Les rendements massiques des extraits de polysaccharides hydrosolubles se situent entre 0,49% pour *Zizyphus lotus* et 1,46% pour *Malva parviflora* et *Plantago notata*. L'étude de la composition des différents extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles après lyophilisation, laissent remarquer des valeurs moyennes de 16,97± 4,8 % d'humidité relative, 25,99 ± 15,29% de cendres totales, 26,3 ± 2,97% de protéines totales et 28,79 ± 10,18% d'oses totaux. Parmi les oses, 39,87± 3,62% sont des oses acides et le reste, soit 60,13 ± 8,34% sont des oses neutres.

L'étude de la cinétique de l'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles par l'acide trifluoroacétique à 4 M durant 5 heures à 80°C, laissent apparaître après analyse par chromatographie sur couche mince (CCM), que les extraits issus des feuilles de *Rumex vesicarius* et de *Plantago notata,* renferment de l'arabinose, du glucose, de l'acide glucuronique et du galactose. L'analyse par chromatographie échangeuse d'anions, de haute performance, à détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC-PAD), des oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora;* donne 56,86% de galactose, 20,57% d'acide glucuronique, 9,04% d'arabinose, 8,46% de rhamnose et 5,05% de mannose. De même, les polysaccharides hydrosolubles issus des feuilles d'*Asphodelus tenuifolius,* ont une prédominance de mannose à 39,25% et de glucose à 31,55%, suivie de 10,92% de l'acide glucuronique et 8,9% d'arabinose. Pour celles des feuilles de *Zizyphus lotus,* elles sont constituées majoritairement 30,74% de galactose, 27,34% de glucose, 26,03% de rhamnose, 12,25% d'arabinose et un faible pourcentage d'acide glucuronique soit 3,62%.

L'étude des hydrolysats partiels des différents extraits de polysaccharides hydrosolubles de *M. parviflora*, *A. tenuifolius*, *R. vesicarius*, *Z. lotus* et *P. notata*, en milieu de culture additionné chez *Klebsiella pneumonea pneumonea,* montre une activité biologique sur cette souche. Les hydrolysats partiels des extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* et *Zizyphus lotus,* à concentration de 0,333 mg/ml, stimulent de manière significative, pour 0,1 DO après 24 heures, la croissance de *Klebsiella pneumonea pneumonea* et l'action prèbiotique des oligosaccharides issus de ces hydrolysats sur cette souche est notable.

Mots clés: Polysaccharides, plantes spontanées, médicinal, hydrolyse, effet, bactérie.

ABSTRACT

Crude water-soluble polysaccharides are extracted from the leaves of the spontaneous plants as traditional medicine uses *Malva parviflora* (Malvaceae), *Asphodelus tenuipholius* (Liliaceae), *Zizyphus lotus* (Rhamnaceae), *Rumex vesicarius* (Polygonaceae), and *Plantago notata* (Plantaginaceae), obtained by distilled water extraction during 24 hours after elimination of ethanolic extracts, then used ethanol 75% for precipitation of polysaccharides . The yields of extract are located between 0,49% and 1,46%. The crude water-soluble polysaccharides extracts were further characterized and revealed the average values: 16,97± 4,8% moisture, 25,99 ± 15,29% ashes, 26,3 ± 2,97% proteins and 28,79 ± 10,18% carbohydrates, among them 39,87± 3,62% are acidic monosaccharides and the rest 60,13 ± 8,34% are neutral monosaccharides.

the hydrolysis of crude water-soluble polysaccharides by trifluoroacetic acid to 4 M during 5 hours at 80°C, shows after analysis by thin layer chromatography (TLC), that the water-soluble polysaccharides of the leaves of *Rumex vesicarius* and *Plantago notata* are constituted mainly of arabinose, glucose, glucuronic acid and probably of galactose. The identification of monosaccharides composition by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) methods of crude water-soluble polysaccharides from *Malva parviflora* leaves shows 56.86% galactose, 20.57% glucuronic acid, 9.04% arabinose, 8.46% rhamnose and 5.05% mannose. In the same way, the crude water-soluble polysaccharides of *Asphodelus tenuifolius* leaves shows a predominance of mannose 33.45% and glucose 26.89%, consistent of 9.31% glucuronic acid and 7.59% arabinose. The crude water-soluble polysaccharides of *Zizyphus lotus* leaves is constituted 23,95% galactose, 21,30% glucose, 20,28% rhamnose, 9,55% arabinose and a weak percentage of glucuronic acid 2,82%. the partial hydrolysates concentration of 0,333 mg/ml, stimulate significantly for 0,1 DO after 24 hours, the multiplication of *Klebsiella pneumonea pneumonia* and prebiotic effect of the oligosaccharides from these hydrolysates on this are very likely.

Keywords: Polysaccharides, plants spontaneous, medicinal, hydrolysis, effect, bacteria.

.

ملخص

يهدف هدا العمل أولا إلى استخلاص السكريات المتعددة الذائبة في الماء من أوراق النباتات التلقائية ذات الميزة الطبية *Malva parviflora* (Malvaceae), *Asphodelus tenuipholius* (Liliaceae), *Zizyphus lotus* (Rhamnaceae), *Rumex vesicarius* (Polygonaceae), *Plantago notata* (Plantaginaceae),باستعمال الماء المقطر في درجة حرارة عادية لمدة 24 ساعة بعد نزع مستخلص كحول الايثانول، ثم ترسيب هذه السكريات المتعددة بكحول الايثانول 75 ٪ و تجفيفها. يتراوح مردود مستخلصات السكريات المتعددة الذائبة في الماء بين 0.49٪ عند*Zizyphus lotus* و1.46٪ عند *Malva parviflora* و *Plantago notata*. كشفت دراسة مكونات مختلف المستخلصات على احتوائها بمعدل 16.97 ± 4.8 ٪ من الرطوبة، 25.99 ± 15.29 ٪ من إجمالي الرماد، 26.3 ± 2 97 ٪ من إجمالي البروتين و28.79 ± 10.18 ٪ من إجمالي السكر .يشمل إجمالي السكر60.13 ± 8.34 ٪ سكريات محايدة و 39.87 ± 3.62 ٪ سكريات حمضية.

إن دراسة حركية التحلل المائي للسكريات المتعددة الذائبة في الماء بحمض trifluoroacetic 4M لمدة 5 ساعات في 80 درجة مئوية، و بعد التحليل باستعمال كروماتوغرافية على الصفائح الرقيقة دلت على احتوائها في كل من *Rumex vesicarius* و *Plantago notata* على الارابنوز، الجلوكوز، وحامض الجلوكورونيك.

أظهرت التحاليل باستعمال كروماتوغرافية تبادل الأنيونات رفيعة الجودة للسكريات المتعددة الذائبة في الماء المستخلصة من أوراق *Malva parviflora* أنها تحتوى على 56.86٪ سكر اللبن، 57٪ من حامض الجلوكورونيك، 9.04 ٪ من الارابنوز، 8.46 ٪ من الرامنوز و 5.05 ٪ من المانوز. وبالمثل، السكريات المتعددة الذائبة في الماء المستخلصة من أوراق *Asphodelus tenuipholius* تحتوى على 33.45 ٪ من المانوز و 26.89 ٪ من الجلوكوز، تليها 9.31 ٪ من حامض الجلوكورونيك و7.59 ٪ من الارابنوز. أما السكريات المتعددة الذائبة في الماء المستخلصة من أوراق *Zizyphus lotus* ، تتألف أساسا من 23.95 ٪ من سكر اللبن، 21.30 ٪ من الجلوكوز، 20.28 ٪ من الرامنوز، 9.55 ٪ من الارابنوز ونسبة مئوية صغيرة من حامض الجلوكورونيك2.82 ٪.

إن دراسة التحلل الجزئي لمختلف السكريات المتعددة الذائبة في الماء المستخلصة من أوراق النباتات *M. parviflora, A. tenuifolius, R. vesicarius, Z. lotus* et *P. notata* في الوسط المعيشى لـ *Klebsiella pneumonea pneumonea* أظهرت النشاط البيولوجي على هذه السلالة. التحلل الجزئي للسكريات المتعددة الذائبة في الماء المستخلصة من أوراق النبتتين *M. parviflora* و*Z. lotus*، بتركيز 0.333 ملغ / مل وحفز بشكل معتبر،0.1 DO بعد 24 ساعة، نمو *Klebsiella pneumonea pneumonea* *وتاثير السابق البيولوجى للقطع السكرية الصغيرة الناتجة عن* التحلل الجزئي لهدين المستخلصين وارد جدا.

الكلمات المفتاحية: السكريات المتعددة، النباتات التلقائية، الطبية، التحلل المائي، البكتيريا.