



**HAL**  
open science

# Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bunge*

Toufik Chouana

► **To cite this version:**

Toufik Chouana. Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bunge*. Biologie végétale. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC112 . tel-02414068

**HAL Id: tel-02414068**

**<https://theses.hal.science/tel-02414068>**

Submitted on 16 Dec 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE  
CLERMONT AUVERGNE  
ANNEE 2017



UNIVERSITE  
KASDI MERBAH DE OUARGLA  
ANNEE 2017



ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,  
ENVIRONNEMENT

N° d'ordre :

## Thèse

Présentée à l'Université Kasdi Merbah de Ouargla pour l'obtention  
du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITE  
(Spécialité : Nutrition et Sciences des Aliments)

Soutenue le 22 Novembre 2017

CHOUANA Toufik

---

### Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bunge*.

---

#### Rapporteurs :

Mme Noria SMAIL-SAADOUN, Professeur, Université Mouloud Mammeri- Algérie  
Mme Ingrid FRUITIER-ARNAUDIN, Maître de conférences, HDR, Université de la  
Rochelle – France

#### Membres :

Mme Farida MOULTI-MATI, Professeur, Université Mouloud Mammeri - Algérie  
Mr Cédric DELATTRE, Maître de conférences, Université Clermont Auvergne - France  
Mr Philippe MICHAUD, Professeur des Universités, Université Clermont Auvergne -  
Directeur de thèse - France  
Mr Mohamed Didi OULD ELHA DJ, Professeur, Université Kasdi-Merbah – Algérie

CNRS, UMR 6602, Institut Pascal, 63178 Aubière, France

## SYMBOLES ET ABREVIATIONS

Å : Ångström

AA : Arthrite induite par adjuvant

AAPM : Iditols partiellement méthylés

ABCA1 : ATP-binding cassette 1

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGA : Apiogalacturonane

ALP : Phosphatase alcaline

ALT : Alanine aminotransférase

APS : Polysaccharides des Astragales

Ara : Arabinose

AST : Aspartate aminotransférase

AX : Arabinoxylanes

BSA : Albumine de sérum bovin

BSTFA : Bis (triméthysilyle) trifluoroacétamide

C : Concentration de polymère

CAT : Catalase

C-BSA : Albumine de sérum bovin cationique

CES : Chromatographie d'exclusion stérique

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CI<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice médiane

cm : Centimètre

CMEP : Comité mixte d'évaluation et de prospective

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

COSY : COrrélation SpectroscopY

CPS : Polysaccharides capsulaires

D<sub>2</sub>O : Deutérium

Da : Dalton

DAMD : Analyse du polymorphisme de séquences minisatellites

DEAE : Chromatographie d'échange d'ions

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DM2 : Diabète de type 2  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DP : degré de polymérisation  
ECM : Matrice extracellulaire  
ECOSYS : Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semi arides  
EI : Impact électronique  
ELISA : Méthode immuno-enzymatique  
EPS : Exopolysaccharide  
ERO : Espèces réactives de l'oxygène  
eV : Electron-volt  
FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux  
FTIR: Fourier Transformed Infrared Spectroscopy  
Fuc: Fucose  
g: Gravité  
g: Gramme  
GAGs: Glycosaminoglycanes  
Gal: Galactose  
GDP-mannose: Guanosine diphosphate mannose  
Glc : Glucose  
GlcA : Acide glucuronique  
GlcN : Glucosamine  
GM: Galactomannane  
GOT: Glutamate oxalate transaminase  
GPT: Glutamate pyruvate transaminase  
GSH-P: Glutathion peroxydase  
GAX: Glucuronoarabinoxylane  
GX : Glucuroxylanes  
HA : Acide hyaluronique  
HG : Homogalacturonane  
HIV : Virus de l'immunodéficience humaine  
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond

HMGB1: High-mobility group box 1  
HPAEC : Chromatographie ionique haute pression  
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance  
HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation  
Hz: Hertz  
IBDV : Virus de la bursite infectieuse  
IdoA : Acide iduronique  
IFN : Interféron  
IL : Interleukine  
iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible  
IR : Infra-rouge  
IRLC : Inverted Repetition Lacking Clade  
ISSR : Séquences simples internes répétées  
k : Constante de temps (s)  
L : Litre  
LDH : Lactate déshydrogénase  
LDL : Lipoprotéines de basse densité  
LPS : Lipopolysaccharides  
M : Molaire  
Man : Mannose  
MDA : Malondialdéhyde  
MDR : Résistance multiple aux médicaments  
MGX : Méthylglucuronoxylanes  
mHBP : Méta-hydroxybiphényle  
min : Minute  
mL : Millilitre  
mM : Millimolaire  
mol : Mole  
**M<sub>w</sub>** : Masse molaire moyenne en poids du polymère  
n : Indice de fluidité  
**N<sub>A</sub>** : Nombre d'Avogadro  
NF-κB : Facteur de transcription nucléaire-κB

nm: Nanomètre

NO: Oxyde nitrique

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

nrDNA ITS : Séquençage des gènes ribosomiaux

OA : Oses acides

OGAs : Oligogalacturonides

ON : Oses neutres

OT : Oses totaux

PAD : Détecteur par ampérométrie pulsée

Pa: Pascal

Psi: Pound per square inch

RAPD : Amplification aléatoire d'ADN polymorphe

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de Restriction

Rg : Rayon de giration (nm)

RG-I: Rhamnogalacturonane I

RG-II: Rhamnogalacturonane II

Rha : Rhamnose

RMN : Résonance Magnétique et Nucléaire

ROCK: Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase

rpm : Rotation par minute

Rpoc : ARN polymérase chloroplastiques

S : Seconde

SAB : Sérum albumine bovine

SD : Sprague-Dawley

SDMO : Systèmes de délivrance de médicament contrôlés par voie orale

SEC/MALLS: Size Exclusion Chromatography-Multi-Angle Laser Light Scattering

Ser : Sérine

SOD : Superoxyde dismutase

TFA : Acide trifluoroacétique

THG: Temperate herbaceous group

TMCS: Trimethylchlorosilane

TMS : Triméthylsilyle

TNF : Facteur de nécrose tumorale  
UDP-galactose : Uridine diphosphate galactose  
UMR : Unité mixte de recherche  
VHB : Virus de l'hépatite  
XG : Xyloglucanes  
XGA : Xylogalacturonane  
Xyl : Xylose  
 $\delta$  : Déplacements chimiques (ppm)  
 $\lambda_0$  : Longueur d'onde du faisceau incident (nm)  
 $\nu_0$  : Fréquence du champ statique.  
 $\nu_i$  : Fréquence de résonance du noyau i  
 $\delta$  : déphasage ou angle de perte (rad)  
 $\gamma_0$  : amplitude de la déformation ( $s^{-1}$ )  
 $\gamma$  : Taux de cisaillement ( $s^{-1}$ )  
 $\omega$  : fréquence ( $rad.s^{-1}$ )  
 $\sigma$  : contrainte (Pa)  
 $\sigma_0$  : amplitude de la contrainte (Pa)  
 $\delta$  : déphasage ou angle de perte (rad)  
 $\eta_0$  : Viscosité à cisaillement nul (Pa.s)  
 $\omega$  : fréquence ( $rad.s^{-1}$ )  
 $\sigma$  : contrainte (Pa)  
 $\sigma_0$  : amplitude de la contrainte (Pa)  
 $n_0$  : Indice de réfraction du solvant  
% : Pourcent, pour cent  
 $\Delta R_0$  : Rapport de Rayleigh  
°C : Degré Celsius  
 $\mu L$  : Microlitre  
 $\eta_0$  : Viscosité absolue du solvant pur (Pa.s)  
 $\eta_r$  : Viscosité relative (Pa.s)  
 $\eta_{sp}$  : Viscosité spécifique (Pa.s)  
[ $\eta$ ] : Viscosité intrinsèque (mL/g)  
 $\eta_{red}$  : Viscosité intrinsèque réduite (mL/g).

$\eta$  : viscosité dynamique ou viscosité apparente (Pa.s)

F : Force de frottement visqueux (N)

S : Surface en contact avec le fluide (m<sup>2</sup>)

dv : Différence de vitesse entre les deux couches (m.s<sup>-1</sup>)

dz : Distance séparant les deux couches de fluides contiguës (m)

# TABLE DES MATIERES

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.1. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Astragalus</i> et activités biologiques.....	4
1.1.1. Les Fabacées.....	4
1.1.1.1. Le genre <i>Astragalus</i> .....	4
1.1.1.1.1. Répartition et écologie .....	5
1.1.1.1.2. Le genre <i>Astragalus</i> en Algérie .....	5
1.1.1.1.3. Historique de la classification du genre <i>Astragalus</i> .....	8
1.1.1.1.4. Description botanique du genre <i>Astragalus</i> .....	10
1.1.1.1.4.1. <i>Astragalus gombo</i> Cosse et Dur.....	12
1.1.1.1.4.1.1. Description botanique.....	12
1.1.1.1.5. Importance économique et usages traditionnels de quelques espèces du genre <i>Astragalus</i> .....	14
1.1.1.1.6. Propriétés pharmacologiques et activités biologiques des espèces du genre <i>Astragalus</i> .....	14
1.1.1.1.7. Utilisations médicinales des espèces du genre <i>Astragalus</i> .....	15
1.1.1.1.8.2. Activité immunomodulatrice .....	20
1.1.1.1.8.3. Activités anti tumorale et anticancéreuse .....	21
1.1.1.1.8.4. Activités anti diabétiques et hypoglycémiantes .....	22
1.1.1.1.8.5. Activité hépato-protective .....	24
1.1.1.1.8.6. Activité anti-inflammatoire .....	24
1.1.1.1.8.7. Activité anti-athérosclérose .....	25
1.1.1.1.8.8. Activité antivirale.....	26
1.1.1.1.9. Intoxication par les Astragales.....	26
1.2. Généralités sur les polysaccharides .....	27
1.2.1.1. Polysaccharides bactériens et fongiques .....	30
1.2.1.2. Polysaccharides d'algues.....	37
1.2.1.2.1. Polysaccharides non-sulfatés .....	37
1.2.1.2.2. Polysaccharides sulfatés .....	39
1.2.1.2.3. Carraghénanes.....	39
1.2.1.2.4. Fucoïdanes .....	41
1.2.1.2.5. Ulvanes .....	41
1.2.2. Polysaccharides d'origine animale .....	42
1.2.2.1. Le glycogène .....	42

1.2.2.2. La chitine.....	42
1.2.2.3. Les glycosaminoglycanes.....	44
1.2.2.3.1. L'acide hyaluronique (HA) .....	44
1.2.2.3.2. L'héparine .....	46
1.2.3.1.1. La Cellulose.....	48
1.2.3.1.4. Les glucanes .....	51
1.2.3.1.5. Les pectines .....	52
1.2.3.2. Les polysaccharides de réserves.....	56
1.2.3.2.1. L'amidon .....	56
1.2.3.2.2. Les mannanes .....	58
1.2.3.2.3. Les galactomannanes (GM).....	58
1.2.3.2.3.1. Les principaux GM valorisés.....	58
1.2.3.2.3.1.1. La gomme de caroube .....	59
1.2.3.2.3.1.2. La gomme guar .....	60
1.2.3.2.3.1.3. La gomme de tara.....	60
1.2.3.2.3.1.4. La gomme cassia.....	61
1.2.3.2.3.1.5. La gomme fenugrec.....	61
1.2.3.2.3.2. Structures et propriétés des GM.....	61
1.2.3.2.3.3. Métabolisme des galactomannanes .....	64
1.2.3.2.3.3.1. Accumulation et biosynthèse .....	64
1.2.3.2.3.3.2. Les fonctions biologiques des GMs dans la paroi cellulaire. ....	68
1.2.3.3. Exsudats et mucilages .....	72
<b>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>74</b>
2.1. Préparation du matériel biologique.....	74
2.2. Extraction et purification des polysaccharides d' <i>Astragalus gombo</i> .....	75
2.2.1. Extraction des polysaccharides hydrosolubles issus des tiges .....	75
Extraction à l'eau distillée (pH=5,9) : .....	75
Extraction à la soude (pH= 12,3) : .....	75
Extraction à l'acide chlorhydrique (pH= 1,3) :.....	76
2.2.2. Extraction des polysaccharides hydrosolubles issus des graines d' <i>Astragalus gombo</i> ..	78
2.3. Calcul du rendement d'extraction.....	80
2.4. Dosages colorimétriques .....	80
2.4.1. Dosage des oses .....	80
2.4.1.1. Dosage des oses totaux par la méthode de Dubois .....	80
2.4.1.2. Dosage des oses acides (OA) et des oses neutres (ON) .....	81
2.4.1.2.1. Dosage des oses acides (OA).....	81
2.4.1.2.2. Dosage des oses neutres (ON) .....	81

2.4.1.2.3. Détermination de la concentration en OA et ON.....	82
2.4.2. Dosage des sucres réducteurs.....	82
2.4.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	83
2.5. Caractérisation structurale des polysaccharides.....	84
2.5.1. Détermination des monosaccharides constitutifs.....	84
2.5.1.1. Chromatographie ionique haute pression (HPAEC-PAD).....	84
2.5.1.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG/SM-EI.....	86
2.5.3. Analyses spectroscopiques.....	92
2.5.3.1. Analyses par spectroscopie infrarouge.....	92
2.5.3.2. Analyses par spectroscopie de Résonance Magnétique et Nucléaire (RMN).....	93
2.6. Caractérisation physico-chimique des polysaccharides.....	94
2.6.1. Détermination de la masse moléculaire par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière (SEC/MALLS).....	94
2.6.2. Détermination de la masse moléculaire par chromatographie d'exclusion stérique.....	97
2.6.3. Etude rhéologique des polysaccharides d' <i>Astragalus gombo</i> .....	99
2.6.2.2. Mesure de la viscosité.....	104
2.7. Etude des activités biologiques.....	107
2.7.1. Activités prébiotiques des polysaccharides.....	107
2.7.1.1. Etude de la digestibilité in vitro des polysaccharides.....	108
2.7.1.2. Etude des activités prébiotiques des polysaccharides sur <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103.....	108
2.7.2. Dosage de l'activité anti-oxydante des polysaccharides.....	109
2.7.2.1. Test anti-radicalaire par le dosage au 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).....	110
2.7.3. Inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase.....	110
2.7.4. Activité phagocytaire.....	112
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>115</b>
3.1. Extraction et composition globale des polysaccharides extraits d' <i>Astragalus gombo</i> bunge.....	115
3.1.1. Extraction des polysaccharides des tiges d' <i>Astragalus gombo</i> bunge.....	115
3.1.2. Composition globale des extraits polysaccharidiques des tiges d' <i>Astragalus gombo</i> ..	117
3.1.3. Analyse des extraits polysaccharidiques par spectroscopie infra-rouge (FT-IR).....	118
3.1.4. Composition osidique.....	120
3.1.4.1. Analyse Chromatographique en Phase Gazeuse.....	120
3.2. Extraction et composition globale des polysaccharides extraits des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge.....	123
3.2.1. Composition chimique de la fraction GM.....	123
3.2.2. Caractérisation structurale de l'extrait hydrosoluble des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge.....	124

3.2.2.1.1. Composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique (GM) des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge.....	124
3.2.2.2. Détermination de la masse moléculaire de la fraction GM.....	125
3.2.2.3. Analyse des liaisons glycosidiques du GM extrait des graines d' <i>A. gombo</i> .....	127
3.2.2.4. Étude de la dégradation par voie chimique du polysaccharide extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i> bunge.....	128
3.2.2.5. L'analyse par spectroscopie <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C RMN de polysaccharide extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i> .....	130
3.3. Etudes rhéologique du GM extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge. ....	134
3.3.1. Etudes des propriétés d'écoulement des solutions de GM.....	134
3.3.2 Etudes des propriétés du GM en mode oscillatoire. ....	135
3.3.3. Concentration critique de recouvrement C*.....	136
3.3.4. Effet de la température et de la concentration en GM sur la viscosité. ....	137
3.3.5. Effet couplé de la température et de la vitesse de cisaillement sur la viscosité. ....	139
3.4. Propriétés biologiques et évaluation du potentiel prébiotique du GM extrait des graines d' <i>A. gombo</i> Bunge. ....	141
3.4.1. Détermination de la digestibilité du GM extrait des graines d' <i>A. gombo</i> Bunge.....	141
3.4.2. Tests prébiotiques.....	144
3.4.3. Activité antioxydante.....	147
3.4.4. Inhibiteurs de l'alpha glucosidase et contrôle du diabète.....	148
3.5.5. Etude de l'activité phagocytaire.....	149
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	150
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	152

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition géographique des espèces appartenant au genre <i>Astragalus</i> .	5
Figure 2: Historique de la taxonomie du genre <i>Astragalus</i> L. (Wojciechowski <i>et al.</i> , 1999).	9
Figure 3: Cladogramme des relations phylogénétiques au sein du groupe IRLC (Wojciechowski, 2005).	10
Figure 4: Quelques espèces du genre <i>Astragalus</i> présentes en Algérie (Ozenda 2004).	12
Figure 5: Photographie d' <i>Astragalus gombo</i> Cosse and Dur (prise à Ouargla en 2014 par l'auteur).	13
Figure 6: Quelques gousses des plantes du genre <i>Astragalus</i> présentes en Algérie (Ozenda 2004).	13
Figure 7: Chaîne de dextrane avec trois points de départ de chaînes latérales (D'après Heinze <i>et al.</i> , 2006).	31
Figure 8: Structure du curdlane.	32
Figure 9: Structure du xanthane.	33
Figure 10: Structure de l'unité de répétition tétrasaccharidique du gellane.	34
Figure 11: Structure des $\beta$ -glucanes.	35
Figure 12: Structure des alginate (Coviello <i>et al.</i> , 2007).	38
Figure 13: Localisation d'un site de chélation d'un ion calcium (●) sur un bloc M (A) et d'un bloc G (B) (D'après Braccini <i>et al.</i> , 1999).	38
Figure 14: Structure des carraghénanes (Coviello <i>et al.</i> , 2007).	40
Figure 15: Structure du glycogène (Pal <i>et al.</i> , 2015)	42
Figure 16: Structure de la chitine	43
Figure 17: Unité de répétition disaccharidique du hyaluronane.	45
Figure 18: Représentation schématique d'une partie de la matrice extracellulaire avec un agrandissement du complexe protéoglycane-HA (Funasaki <i>et al.</i> , 2000).	46
Figure 19: Différents niveaux structuraux des molécules de cellulose dans la paroi cellulaire de la plante (Agarwal 2006 et Moon <i>et al.</i> , 2011).	47
Figure 20: Structure de la cellulose ; n= degré de polymérisation (dp) (Wondraczek et Heinze, 2015).	49
Figure 21: Liaisons hydrogènes inter- et intrachânes de cellulose.	49
Figure 22: structure primaire des Xylanes.	51
Figure 23: Structure des xyloglucanes (Ebringerva <i>et al.</i> , 2005).	52
Figure 24: Structures des hémicelluloses et des pectines (Ramawat et Merillon 2015).	53
Figure 25: Structure des homogalacturonanes (HG) (Ochoa 2012)	54
Figure 26: Structure des RG-I (Wong, 2008)	55
Figure 27: Structure des RG-II (Wong, 2008)	55
Figure 28: Chaînes latérales (A-D) de RG-II isolée à partir des parois cellulaires d'un angiosperme (Matsunaga <i>et al.</i> , 2004).	56
Figure 29: Structures de l'amylose et de l'amylopectine (Dufresne 2015).	57
Figure 30: Gomme de caroube. (a) gousses, (b) graines et (c) farine (Prajapati <i>et al.</i> , 2013).	59
Figure 31: Gomme de guar (a) gousses, (b) graines et (c) farine (Prajapati <i>et al.</i> , 2013)	60
Figure 32: Gomme de tara. (a) gousses, (b) graines et (c) farine (Prajapati <i>et al.</i> , 2013).	61
Figure 33: Gomme de fenugrec (a) la plante, (b) graines et (c) farine (Prajapati <i>et al.</i> , 2013).	61

Figure 34: Coupe transversale d'une graine de caroube (d'après Dakia <i>et al.</i> , 2008).	66
Figure 35: Voies biochimiques impliquées dans le catabolisme du GM et de ses produits par l'embryon.	68
Figure 36: Situation géographique de la zone de récolte.	74
Figure 37: Extraction aqueuse à pH neutre, acide et alcalin des polysaccharides des tiges d' <i>Astragalus gombo</i> .	77
Figure 38: Extraction aqueuse des polysaccharides de graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge.	79
Figure 39: Diagramme des potentiels appliqués à l'électrode d'or d'un détecteur ampérométrique pour la détection des sucres (www.dionex.com).	84
Figure 40: Exemple de l'oxydation du glucose sur une électrode d'or en ampérométrie pulsée.	85
Figure 41: Triméthylsilylation des O-glycosides (Kamerling <i>et al.</i> , 2007).	87
Figure 42: Schéma d'une source à ionisation par impact électronique	88
Figure 43: Formation des AAPM (Garon-Lardière, 2004).	90
Figure 44: Ordre de clivage préférentiel au sein des AAPM (Garon-Lardière, 2004).	91
Figure 45: Profil d'élution des standards de dextranses (Mw) : 500000 Da (bleu) ; 200000 Da (rouge) ; 150000 Da (vert foncée) ; 70000 Da (rose) ; 40000 Da (jaune) ; 6000 Da (mauve) et de raffinose (Mw) : 504,5 Da (vert-clair)	98
Figure 46: Courbe d'étalonnage obtenue à partir de différents standards	99
Figure 47: Schéma du principe de l'écoulement de cisaillement simple.	100
Figure 48: Comportements rhéologiques de liquides aux propriétés physiques différentes.	102
Figure 49: Exemple de détermination graphique de la concentration critique de recouvrement C*.	103
Figure 50: Etats d'enchainement des polymères en fonction de la concentration.	104
Figure 51: Rhéomètre AR-G2 (TA Instruments, France)	105
Figure 52: Rhéomètre de géométrie plan/plan	105
Figure 53: Dégradation du p-nitrophenyl $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) par l' $\alpha$ -glucosidase.	111
Figure 54: Spectres infra-rouges des polysaccharides (A) PS1, (B) PS2 et (C) PS3 issus des tiges d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge.	119
Figure 55: Chromatogrammes des polysaccharides PS1, PS2 et PS3 extraits des tiges, hydrolysés au TFA, triméthylsilylés et analysés par CG/SM-EI. Avec Gal: Galactose; Ara: Arabinose; Rha: Rhamnose ; Glc: Glucose ; Xyl: Xylose; GalA: Acide galacturonique.	121
Figure 56: Chromatogramme du polysaccharide extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge, hydrolysé au TFA (2 M), triméthylsilylé et analysé par CG/SM-EI. Avec Gal : Galactose ; Man : Mannose.	125
Figure 57: Evolution de (A) la masse moléculaire et (B) de la viscosité intrinsèque du polysaccharide extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge. Les analyses sont effectuées sur l'ensemble du volume d'élution (de 12 à 18 mL). Avec dRI : détection réfractométrique.	126
Figure 58: Cinétique d'hydrolyse acide du GM extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i> réalisée à la concentration de 10 g/L dans 100 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (20% v/v) pendant 8h à 50 °C.	129

Figure 59: Evolution des masses moléculaires des différentes familles constitutives du galactomannane d' <i>Astragalus gombo</i> lors de son hydrolyse acide.	130
Figure 60: Spectres RMN (A) <sup>1</sup> H et (B) <sup>13</sup> C de la fraction GMDH à 100 g/L dans le D <sub>2</sub> O. M et G se rapportent respectivement aux unités mannose et galactose	132
Figure 61: Spectre <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C HSQC de la fraction GMHD à 100 g/L dans le D <sub>2</sub> O. M et G se rapportent respectivement aux unités mannose et galactose.	133
Figure 62: Structure proposée pour le polysaccharide extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i> . Avec R pouvant être l'un des groupements suivants : H ou T- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ) ou T- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ [4)- $\alpha$ -D-Galp-(1)n-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ .	134
Figure 63: Influence du taux de cisaillement et de la concentration en GM sur (A) la viscosité et (B) la contrainte de cisaillement.	135
Figure 64: Représentation des modules complexes G' et G'' en fonction de la déformation des solutions aqueuses de GM à 4 et 2 % (m/v) extraits de graines d' <i>Astragalus gombo</i> et à 25 °C.	136
Figure 65: Effet de la température et sur la viscosité des solutions de GM d' <i>A. gombo</i> à des concentrations comprises entre 1 et 4% (m/v).	138
Figure 66: Effet de la concentration sur l'énergie d'activation	139
Figure 67: Effet de la température en fonction de la vitesse de cisaillement sur la viscosité du GM d' <i>A. gombo</i> à 4% (m/v).	140
Figure 68: Effet de la vitesse de cisaillement sur l'énergie d'activation de GM 4%	141
Figure 69: Hydrolyse de l'inuline (A), des FOS (B) et du GM des graines d' <i>A. gombo bunge</i> (C) incubés pendant 6 h dans des sucs gastriques artificiels à des pH compris entre 1 et 5 à 37 °C.	143
Figure 70: Courbes de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sur milieu MRS avec différents types de substrats carbonés à 2% (m/v).	145
Figure 71: Réduction du DPPH en fonction de la concentration en extrait polysaccharidique des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge.	148
Figure 72: Effets inhibiteurs de l'acarbose, PS1, PS2 et PS3 sur l' $\alpha$ -glucosidase.	149

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Espèces du genre <i>Astragalus</i> en Algérie (Quézel et Santa, 1962).	6
Tableau 2: Structures et activités biologiques des polysaccharides isolés de la racine d' <i>A. membranaceus</i> (Jin <i>et al.</i> , 2014)	18
Tableau 3: Principaux homopolysaccharides naturels (Ramawat et Merillon 2015)	29
Tableau 4: Effets des composants des polysaccharides sur leurs propriétés physico-chimiques.	30
Tableau 5: Comparaison des teneurs en polymère (% p / p) entre les parois cellulaires primaires de type I et de type II (Selon Carpita et Gibeaut 1993, Carpita 1996, Carpita et McCann 2000).	48
Tableau 6: Rendements et rapports de M/G pour des GM extraits de différentes graines d'espèces appartenant au genre <i>Astragalus</i> et à quelques légumineuses.	62
Tableau 7: Sources commerciales et alternatives de GMs et leurs applications possibles.	71
Tableau 8: Masses moléculaires et temps d'éluion des standards.	98
Tableau 9: Composition du milieu MRS.	109
Tableau 10: Rendement et couleur des extraits polysaccharidiques des tiges d' <i>Astragalus gombo</i> .	116
Tableau 11: Composition globale des extraits polysaccharidiques des tiges d' <i>Astragalus gombo</i>	117
Tableau 12: Longueurs d'onde caractéristiques des groupes fonctionnels des polysaccharides analysés par spectroscopie Infra-Rouge	118
Tableau 13: Analyse par CG/SM-EI de la composition en monosaccharide (% molaire) des polysaccharides extraits des tiges d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge.	120
Tableau 14: Composition globale des extraits polysaccharidiques des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge	124
Tableau 15: Analyse par CG/SM-EI de la composition en monosaccharide (% molaire) des polysaccharides extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i> Bunge.	124
Tableau 16: Caractérisation du GM extrait des graines d' <i>Astragalus gombo</i>	127
Tableau 17: Identification des acétates d'alditols partiellement O-méthylés (AAPM) et des liaisons glycosidiques correspondantes issus du GM extrait de graines d' <i>Astragalus gombo</i> .	128
Tableau 18: Evolution des masses moléculaires (Da) lors de l'hydrolyse acide des polysaccharides des graines suivies par chromatographie d'exclusion stérique	129
Tableau 19: Déplacements chimiques <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C (ppm) du GM extrait des graines d' <i>A. gombo</i> .	133
Tableau 20: Calcul des énergies d'activation du GM d' <i>A. gombo</i> (4 ; 2 et 1%) et de guar (2 et 1%) pour des températures comprises entre 25°C à 60°C et à un taux de cisaillement fixe de $\dot{\gamma}=100$ s <sup>-1</sup> .	139
Tableau 21: Energies d'activation calculées pour les différentes vitesses de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ = 0,1 à 100 s <sup>-1</sup> ).	140
Tableau 22: Capacité phagocytaire (CP%) et Activité phagocytaire (PA%)	150

# INTRODUCTION GENERALE

### INTRODUCTION GENERALE

Les polysaccharides sont connus et exploités depuis de nombreuses années du fait de leur abondance, de leur caractère renouvelable, de leur non-toxicité, et de leur biodégradabilité. Les polysaccharides hydrosolubles souvent qualifiés d'hydrocolloïdes peuvent être extraits de plantes terrestres, de champignons, de levures, de bactéries, d'algues (micro- et macroalgues), de lichens ou d'animaux. Ces macromolécules disposent de propriétés texturantes exceptionnelles qui les rendent incontournables comme additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ces biopolymères établissent en effet des interactions spécifiques avec l'eau et peuvent épaissir, stabiliser ou gélifier une solution, même à faible concentration. L'intérêt des polysaccharides ne se limite pas à leurs propriétés rhéologiques. Les activités biologiques de certains d'entre eux les désignent en effet comme des molécules susceptibles de modifier les fonctions biologiques de certains organismes. Malgré le développement assez récent des glycobiotecnologies et de la glycomique, les utilisations industrielles des polysaccharides comme actifs biologiques restent encore assez limitées et marginales. Ainsi si on exclut les succès commerciaux de quelques polysaccharides comme agent thérapeutiques, comme actifs dermo-cosmétiques, comme composés nutraceutiques ou comme éliciteurs des réactions de défense des plantes, peu d'entre eux ont fait l'objet d'un vrai développement industriel pour des usages autres que ceux liés à leurs propriétés texturantes. Une des raisons associée à ce faible succès commercial dans le champ des actifs biologiques est très probablement la complexité des structures polysaccharidiques dont l'inventaire est encore très incomplet. Son évolution régulière est souvent associée à des réussites commerciales dues à l'identification de nouvelles relations structure/fonction. Parmi les nombreuses activités biologiques décrites dans la littérature, celles qui suscitent actuellement le plus d'intérêt sont des activités immunostimulantes, antitumorales, antioxydantes, antivirales, anticoagulantes et anti-inflammatoires.

Dans ce contexte et face à une demande industrielle croissante, il est essentiel d'identifier de nouvelles sources de polysaccharides provenant de plantes originales telles que celles poussant dans des conditions climatiques extrêmes et défavorables. En effet ce type d'investigations présente deux intérêts majeurs. Le premier est le potentiel de ces végétaux encore peu étudiés pour l'identification de nouvelles structures polysaccharidiques non décrites dans la littérature. Le second est la possibilité d'exploiter ces plantes dans des environnements non utilisés par l'agriculture et donc de ne pas rentrer en compétition avec la

production de ressources alimentaires. Le désert algérien qui est caractérisé par des conditions climatiques édaphiques très restrictives (précipitations très faibles et températures annuelles moyennes élevées) et une flore bien adaptée à ces conditions suscite actuellement beaucoup d'intérêt pour l'exploration et l'exploitation de ses espèces végétales endémiques. Ces plantes sont souvent riches en polysaccharides du fait de leur physiologie qui leur impose de conserver l'eau et des substrats carbonés sur des périodes longues. C'est dans ce contexte, que le Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semi arides (ECOSYS) de l'Université Kasdi Merbah (Ouargla – Algérie) collabore depuis 2010 avec l'Institut Pascal (UMR CNRS 6602) de l'Université Clermont Auvergne (Clermont Ferrand France). Le Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semi arides, comme son nom l'indique, s'intéresse au recensement, à la caractérisation et à la préservation des écosystèmes propres au Sahara Algérien tandis que l'axe Génie des Procédés, Energétique et Biosystèmes de l'Institut Pascal est spécialisé dans le domaine des bioprocédés appliqués, entre autre, à l'extraction et à la caractérisation de polysaccharides issus de biomasses d'origines diverses. Ces deux structures ont bénéficié en 2014 d'un programme Hubert Curien Tassili (programme Franco-Algérien CMEP - Campus France) intitulé : «Etude physico-chimique et biochimique des polysaccharides extraits d'une sélection de plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans le Sahara septentrional Est Algérien». Ce projet vise (i) à collecter, identifier et exploiter de nouvelles sources de polysaccharides bioactifs à partir de plantes spontanées à caractère médicinal du Sahara septentrional Est algérien (ii) à mettre au point les conditions d'extraction et de purification des polysaccharides de ces plantes, (iii) à caractériser la structure de ces polysaccharides (composition en monosaccharides, liaisons glycosidiques, analyse des substituants, ...), et enfin (iv) à identifier leurs propriétés physico-chimiques en solution (études rhéologiques) et certaines de leurs propriétés biologiques. Une attention particulière est portée à la recherche de relations structures/fonctions en exploitant les données déjà disponibles pour des molécules existantes. Des travaux réalisés au cours de collaborations antérieures entre les deux laboratoires ont permis de mettre en lumière quelques espèces particulièrement intéressantes et notamment des espèces appartenant au genre *Astragalus* (Fabaceae). Ce genre compte 3000 espèces réparties dans des régions arides et continentales en Asie, Amérique et Afrique. Parmi elles, 40 espèces ne sont trouvées qu'au Sahara. L'une de ces 40 espèces, *Astragalus gombo bunge* (Fabaceae), récoltée au Sahara septentrional Est Algérien a fait l'objet de ce travail de thèse. Il s'agit d'une plante pérenne, commune et endémique, fréquemment utilisée comme fourrage animal. Certains polysaccharides issus de feuilles, graines ou racines de plantes appartenant au genre

*Astragalus* ont déjà été décrits pour leurs propriétés antioxydantes, immunomodulatrices antitumorales ou antiinflammatoires. À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée au contenu polysaccharidique d'*Astragalus gombo* Bunge même si un travail récent révèle la présence d'un galactomannane dans les graines d'une autre espèce, *Astragalus armatus*, également présente dans le Sahara Algérien (Boual *et al.* , 2015).

Ce travail de thèse a pour objectif d'extraire, purifier et caractériser les polysaccharides hydrosolubles issus de différents tissus d'*Astragalus gombo* Bunge (*Fabaceae*), et dans un deuxième temps à étudier leurs propriétés rhéologiques et biologiques.

Le manuscrit est organisé en trois parties :

Dans un premier temps les caractéristiques taxonomiques des plantes appartenant au genre *Astragalus* et notamment à l'espèce *Astragalus gombo* Bunge ont été décrites. Les propriétés thérapeutiques de ces plantes et celles de leurs extraits polysaccharidiques ont fait l'objet d'une attention particulière. La seconde partie est une synthèse bibliographique consacrée à un rappel de la structure des principaux polysaccharides décrits à ce jour, à leur classification ainsi qu'à leurs propriétés rhéologiques et biologiques.

La seconde partie du manuscrit s'intitule «matériel et méthodes» et traite des différentes techniques expérimentales mises en œuvre au cours de ce travail concerne les résultats obtenus et leur et discussion. Ces différents chapitres sont précédés d'une introduction générale et suivis d'une conclusion ainsi que de la liste des références bibliographiques qui ont été utilisées.

**CHAPITRE 1**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

---

Ce chapitre traite dans sa première partie des caractéristiques taxonomiques des plantes appartenant au genre *Astragalus* et notamment de l'espèce *Astragalus gombo* Bunge. Il détaillera également les propriétés thérapeutiques de ces plantes et plus particulièrement celles des extraits polysaccharidiques. La deuxième partie de ce chapitre porte sur les polysaccharides, leurs classifications, leurs structures et leurs activités biologiques.

### **1.1. Aperçu bibliographique sur le genre *Astragalus* et activités biologiques**

#### **1.1.1. Les Fabacées**

Les Fabacées sont une des plus importantes familles parmi les dicotylédones (Bonnier, 1905). C'est un groupe comprenant plus de 20000 espèces cosmopolites des régions froides à tropicales (Gepts *et al.*, 2005 ; Cronk *et al.*, 2006). La classification phylogénétique APG III (2009) divise ce groupe en 3 sous familles : Papilionoideae, Caesalpinioideae et Mimosoideae.

La sous famille des Papilionoideae à laquelle appartient le genre *Astragalus*, est monophylétique, cosmopolite et compte près de 11300 espèces réparties en 440 genres (Labat, 1996). Elles sont le plus souvent munies de nodosités racinaires (Raven *et al.*, 2000). Leurs fleurs sont irrégulières et la corolle se présente sous forme de papillon (Baillon, 1867), avec un pétale supérieur (étendard) situé à l'extérieur de deux pétales latéraux (ailes) et deux pétales inférieurs soudés (carène) renfermant le style et des étamines soudées. Le fruit est une gousse, surnommée par les premiers botanistes légume, est un follicule orné d'un seul carpelle possédant deux zones de suture opposées qui, chez les espèces spontanées, s'ouvrent à maturité pour expulser les graines (Caratini, 1984 ; Polhill, 1994).

Certaines Fabacées sont cultivées essentiellement pour leur richesse en protéines (33 % de protéines) pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation du bétail (soja, luzerne,...). D'autres espèces sont cultivées comme espèces ornementales, papetières ou encore comme source de produits chimiques (teintures) et pharmaceutiques.

##### **1.1.1.1. Le genre *Astragalus***

Le genre *Astragalus* est le genre le plus important chez les plantes à fleurs (Watrous et Cane, 2011) et donc également le plus important de la famille des Fabacées (les légumineuses) (Scherson *et al.*, 2008). Il comporte environ 3270 espèces. Il est caractérisé par son fort taux de diversification morphologique et sa large répartition géographique (Zarre et Azani, 2013). Certaines espèces de ce genre peuvent présenter des indices de spéciation et d'endémisme (Sanderson et Wojciechowski, 1996). L'origine probable du genre *Astragalus* est l'Eurasie et

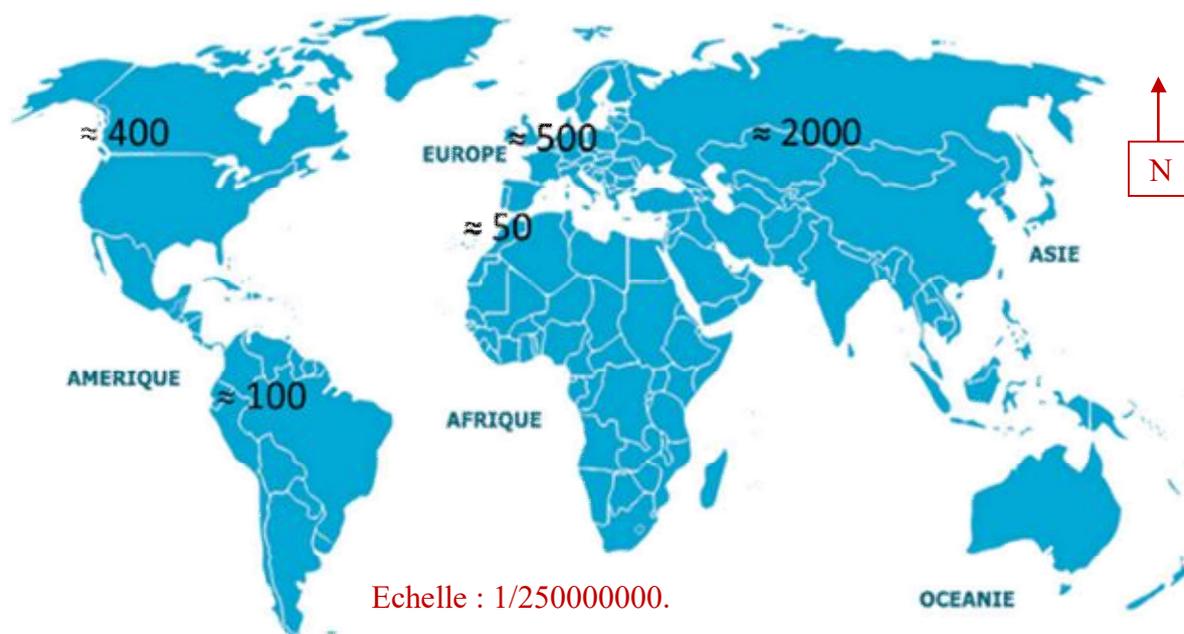
## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

plus précisément les régions situées entre les montagnes du sud-ouest asiatique et le plateau de l'Himalaya (Podlech, 1986 ; Lock et Simpson, 1991).

### 1.1.1.1. Répartition et écologie

Le genre *Astragalus* est réparti partout dans le monde mais majoritairement dans l'hémisphère Nord du globe terrestre (James *et al.*, 1980, **Figure 1**). On trouve une prédominance d'espèces en Asie du sud (1500 espèces), Europe (500 espèces), Amérique du Nord (500 espèces) et Amérique latine. On dénombre ainsi 150 espèces tout le long de la cordillère des Andes (Zarre et Azani, 2013). Dans les pays du bassin Méditerranéen, 500 espèces ont été décrites dont une centaine sont localisées en Afrique du Nord (Dobignard et Chatelain, 2010-2013) et une quinzaine plus spécifiquement au Sahara (Ozenda, 2004). Les noms communs incluent le milkvetch (la plupart des espèces), locoweed (en Amérique du Nord, quelques espèces) et l'épine de chèvre (*A. gummifer*, *A. tragacanthus*).



**Figure 1: Répartition géographique des espèces appartenant au genre *Astragalus*.**

### 1.1.1.1.2. Le genre *Astragalus* en Algérie

En Algérie, le genre *Astragalus* est assez bien représenté (Quézel et Santa, 1962). En effet, la flore algérienne comporte 40 espèces d'Astragales (45 taxons en comptant les sous espèces) dont *Astragalus gombo* Bunge qui a fait l'objet de cette étude (section 1.1.5). Ces espèces se divisent en espèces annuelles et vivaces qui colonisent plusieurs types d'habitat et

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

appartiennent à différentes aires de répartition (**Tableau 1**) comprenant les régions côtières, les hauts plateaux et les régions sahariennes (Quézel et Santa, 1962).

**Tableau 1: Espèces du genre *Astragalus* en Algérie (Quézel et Santa, 1962).**

Espèces	(2n)**	Type de plante	Chorologie	Habitat
<i>A. cruciatus</i> Link.	16	A	Méd.- Sah.	Pâturages, clairières, rocailles arides
<i>A. mauritanicus</i> Coss. et Dur	28	A	Bét.- Rif	Pâturages rocailleux
<i>A. geniorum</i> Maire	16	A	End.	Lit des oueds désertiques
<i>A. corrugatus</i> Bertol.	32	A	Sah.- Sind.	Pâturages désertiques
<i>A. gyzensis</i> Del.	48	A	Sah.- Sind.	Pâturages sablonneux
<i>A. eremophilus</i> Boiss.	16	A	Sah.- Sind.	Lit des oueds sahariens
<i>A. mareoticus</i> Del.	28	A	Sah.- Can.	Steppes, Oueds sahariens
<i>A. gryphus</i> Coss. et Dur.	16	A	End. W.N.A.	Pâturages arides
<i>A. scorpioides</i> Pourret	48	A	Ibéro.- Maur	Broussailles, pâturages
<i>A. sesameus</i> L.	16	A	W. Méd.	Pâturages, forêts claires
<i>A. stella</i> Gouan	16	A	Méd.	Pâturages
<i>A. geniculatus</i> Desf.	16	A	Ibéro.- Maur	Ibéro-Maur Pâturages, forêts
<i>A. sinaicus</i> Boiss.	16	A	Méd.-Iran-Tour	Pâturages arides
<i>A. tribuloides</i> Del.	16	A	Sah	Pâturages désertiques
<i>A. pseudotrigonus</i> Batt. Et Trab.	16	A	End.- Sah.	Pâturages sablonneux désertiques
<i>A. gombo</i> Coss. et Dur.	16	A	End. N. Sah.	Pâturages sablonneux désertiques
<i>A. gomboeformis</i> Pomel	16	A	End. N. Sah.	Pâturages sablonneux désertiques

A : annuelle, V : vivace, N.A. : Nord-Africain, Ibéro-Maur. : Ibéro-Maurétanien, Ibéro-Mar. : Ibéro-Marocain, Mar. : Marocain, Bét- Rif. : Bético-Rifain, Méd. : Méditerranéen, Sah. : Saharien, Sah-Sind. : Saharo-Sindien, Afr. : Africain, End. : Endémique, Trop. : Tropical, Paléo-trop. : Paléo-tropical, Irano-Tour. : Irano-Touranien, Oro. : Montagnard, Eur. : Européen, Can. : Canarien, N. : Nord;S. : Sud; E. : Est; W.: Ouest.

\* D'après Podlech (1987) et réactualisé en Décembre 2011.

\*\* Le nombre de chromosomes est compilé à partir des différents rapports fournis par l'International Organisation of Plant Biosystematists.

N/A : Non répertorié.

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau 1 (suite) : Espèces du genre *Astragalus* en Algérie (Quézel et Santa, 1962).

Espèces	(2n)**	Type de plante	Chorologie	Habitat
<i>A. akkensis</i> Coss.	N/A	A	End. Sah.	Rocailles désertiques
<i>A. Faurei</i> Maire	N/A	V	End. Traras	Rocailles
<i>A. edulis</i> Coss. et Dur.	14, 28	A	Bet.- Mar.	Pâturages
<i>A. hamosus</i> L.	32, 24, 40, 44, 46, 48	A	Méd.	Pâturages, forêts Claires
<i>A. falciformis</i> Desf.	16	V	End. E.N.A.	Pâturages
<i>A. Reinii</i> Ball.	N/A	V	End.G Atlas-Ouar	Broussailles
<i>A. Reinii</i> Ball.	N/A	V	End.G Atlas-Ouar	Broussailles
<i>A. glaux</i> L.	16	V	W. Méd.	Forêts claires. Broussailles
<i>A. bourgeanus</i> Coss.	N/A	V	Ibéro- Mar.	Pâturages
<i>A. incanus</i> L.	16	V	W. Méd.	Pâturages arides
<i>A. monspessulanus</i> L.	16	V	Méd.- Eur.	Forêts claires, pâturages
<i>A. Font-queri</i> Maire et Sennen	N/A	V	End. E.Mar.	Pâturages arides
<i>A. peregrinus</i> Vahl.	16	A	E. Méd.	Steppes
<i>A. Narbonensis</i> Gouan	16	V.	W. Méd	Forêts claires, steppes
<i>A. caprinus</i> L.	16	V	Méd.	Broussailles, pâturages

A : annuelle, V : vivace, N.A. : Nord-Africain, Ibéro-Maur. : Ibéro-Maurétanien, Ibéro-Mar. : Ibéro-Marocain, Mar. : Marocain, Bét- Rif. : Bético-Rifain, Méd. : Méditerranéen, Sah. : Saharien, Sah-Sind. : Saharo-Sindien, Afr. : Africain, End. : Endémique, Trop. : Tropical, Paléo-trop. : Paléo-tropical, Irano-Tour. : Irano-Touranien, Oro. : Montagnard, Eur. : Européen, Can. : Canarien, N. : Nord; S. : Sud; E. : Est; W. : Ouest.

\* D'après Podlech (1987) et réactualisé en Décembre 2011.

\*\* Le nombre de chromosomes est compilé à partir des différents rapports fournis par l'International Organisation of Plant Biosystematists.

N/A : Non répertorié.

### 1.1.1.1.3. Historique de la classification du genre *Astragalus*

La classification du genre *Astragalus* est, encore à ce jour, très confuse et complexe du fait de la ressemblance des caractères morphologiques dans ce taxon (Wojciechowski *et al.*, 1999; Kazempour Osaloo *et al.*, 2005 ; Zarre et Azani, 2013).

La première classification a été publiée dans ‘*Institutiones rei herbariae*’ par Joseph Pitton de Tournefort (1700). Elle distingue deux genres très proches : *Tragacantha* et *Astragaloides*. Plus tard, Linné (1753) regroupe les genres *Astragalus* et *Tragacantha* sous un seul genre, *Astragalus*, qu’il sépare d’un autre genre très voisin, *Phaca* (correspond à *Astragaloides* L.) sur la base de la présence ou de l’absence d’une séparation longitudinale des gousses (Chaudhary *et al.*, 2008). En 1802, de Candolle scinde le genre *Astragalus* en deux genres distincts *Astragalus* et *Oxytropis*, le premier possédant une carène obtuse (enveloppe simple) et une gousse biloculaire à suture ventrale et le deuxième possédant une carène apiculée et une gousse biloculaire à suture dorsale (Baziz, 2015). Par la suite, un grand nombre d’études ont été réalisées à la fois sur les Astragales Américains (Torrey et Gray, 1838 ; Gray, 1864 ; Jones, 1923 ; Rydberg, 1929 ; Johnston, 1938 ; Barneby, 1964 ; Gomez-Sosa, 1979 ; 1981 ; 1982) et Européens (Bunge ,1868 ; 1869 ; Boissier, 1872 ; Gontscharov, 1946 ; Podlech, 1982). Parmi ceux-ci, on distingue les travaux de Bunge (1868) qui établit huit sous genres (*Pogonophace*, *Trimeniaeus*, *Phaca*, *Hypoglottis*, *Calycophysa*, *Tragacantha*, *Cercidothrix* et *Calycocystis*) et 105 sections. En 1983, Podlech souligne la ressemblance des caractères morphologiques utilisés dans la classification infra générique de Bunge et suggère de ramener le nombre de sous genres à trois, sur la base de critères phytodermologiques (trichomes simples ou latéraux). Cependant, Zarre et Podlech (1997) décident, après évaluation des différences morphologiques et anatomiques, de réintégrer ces espèces dans le genre *Astragalus* (**Figure 2**) (Baziz, 2015).

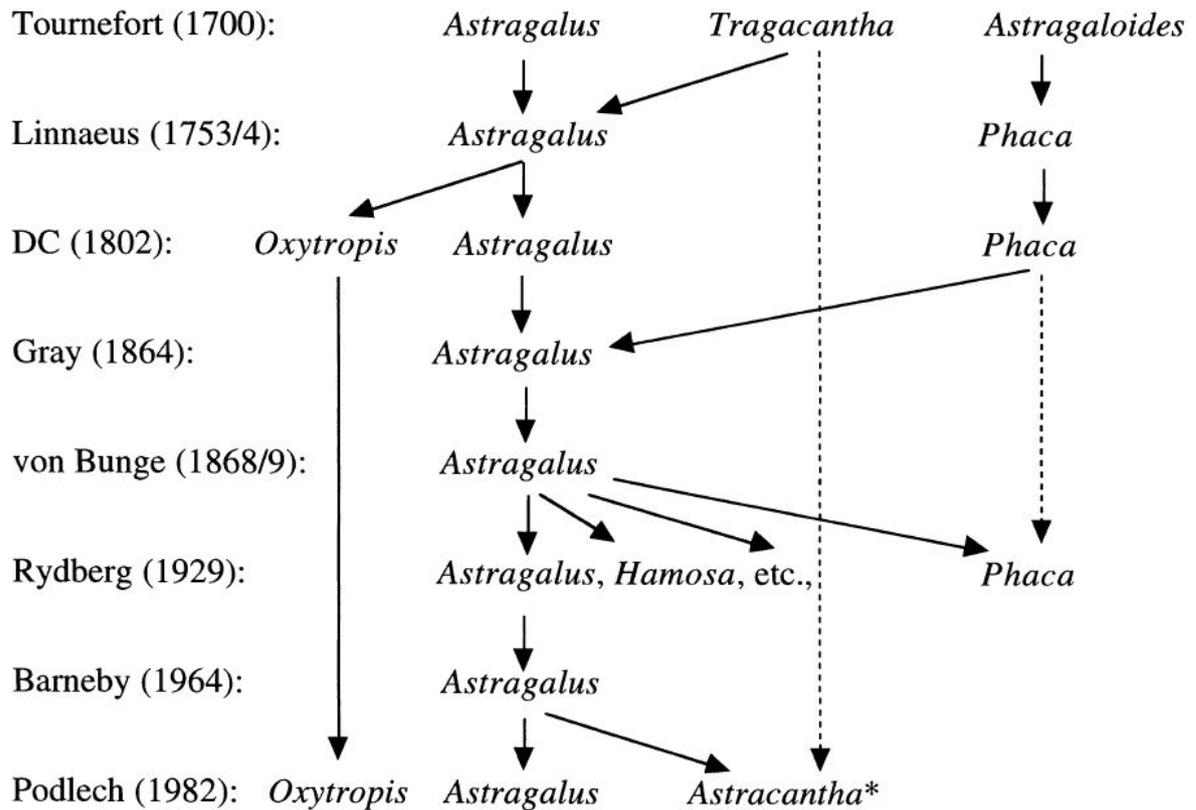


Figure 2: Historique de la taxonomie du genre *Astragalus* L. (Wojciechowski *et al.*, 1999).

Pour élucider définitivement les structures et les relations phylogénétiques du genre *Astragalus*, plusieurs recherches ont été entreprises à l'aide d'outils moléculaires tels que le polymorphisme de longueur des fragments de Restriction (RFLP) ciblant le locus des gènes codant pour les ARN polymérase chloroplastiques *Rpoc 1* et *Rpoc 2* (Sanderson, 1991; Liston, 1992; Sanderson et Doyle, 1993; Wojciechowski *et al.*, 1993; 1999; Liston et Wheeler, 1994; Wojciechowski, 2005), le séquençage des gènes ribosomiaux (nrDNA ITS) et des séquences simples internes répétées (ISSR) (Abdel Samad *et al.*, 2014) mais également l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), et l'analyse du polymorphisme de séquences minisatellites (DAMD) (Chaudhary *et al.*, 2007).

Ces recherches ont permis d'inclure le clade "*Astragalean*" (genre *Astragalus* et genre voisin *Oxytropis*) à l'intérieur du groupe "THG" (temperate herbaceous group) des papilionoïdes de Polhill (1981) qui fait lui-même partie du clade IRLC (Inverted Repetition Lacking Clade ; Figure 3).

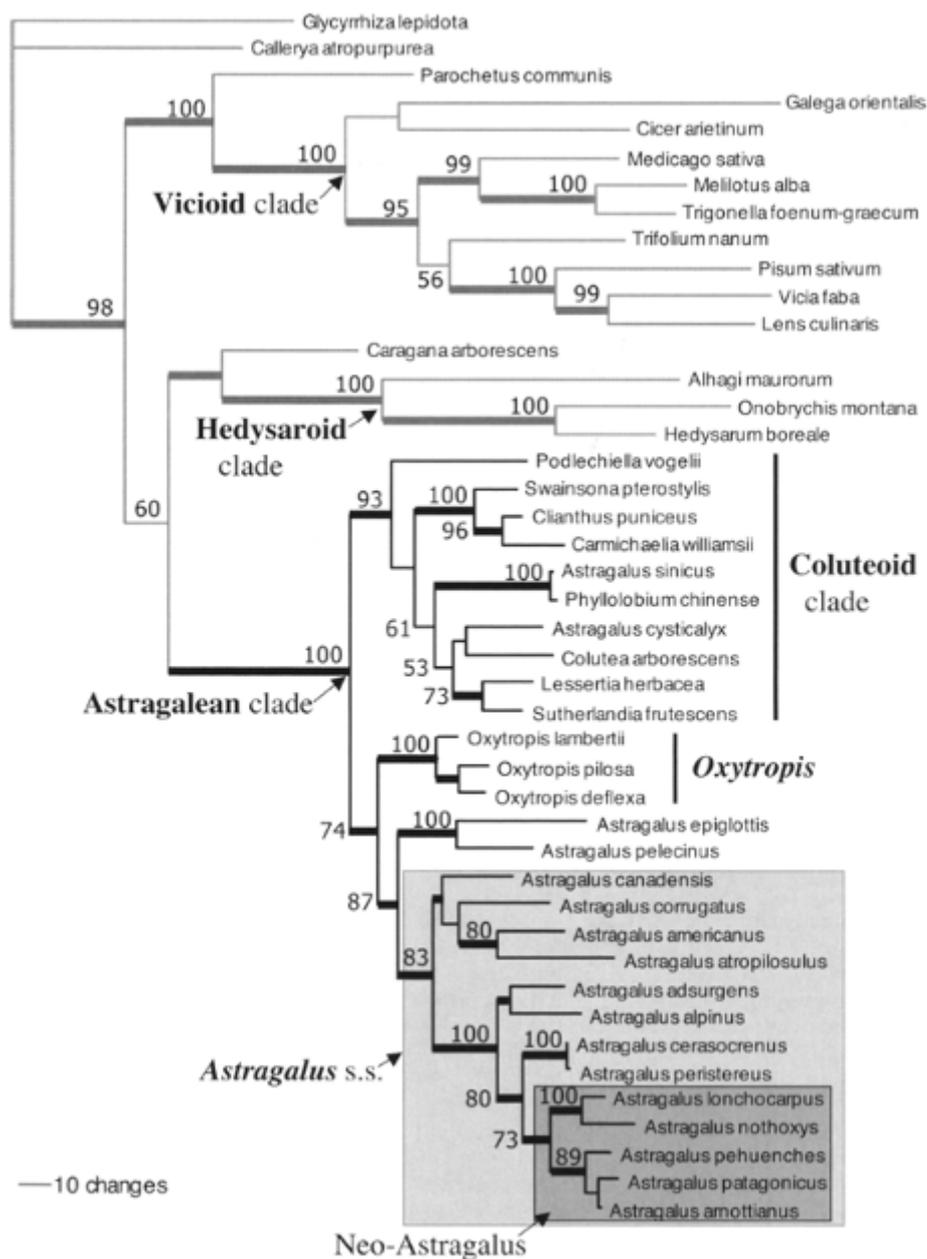


Figure 3: Cladogramme des relations phylogénétiques au sein du groupe IRLC (Wojciechowski, 2005).

#### 1.1.1.1.4. Description botanique du genre *Astragalus*

Les espèces du genre *Astragalus* (Figure 4) sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces à feuilles imparipennées (composées de plusieurs limbes nommés folioles) en général stipulées à plus de 3 folioles. Leur croissance se produit de l'automne au printemps. Elles demeurent vertes en hiver même quand l'herbe est peu disponible (Quezel et Santa, 1962). Les fleurs sont hermaphrodites à périanthe double. Le Calice est caduque ou persistant, tubuleux en cloche à cinq dents subégales ou très inégales. La corolle est papilionacée et ses pétales sont généralement longuement onguiculés (pétales pourvus des onglets apparents), contenant au sommet un ovaire pluri-ovulé à ovules sur 2 rangs de formes variées. Le fruit est une gousse

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

---

de forme variable (**Figure 6**), le plus souvent sec, pluriloculaire rarement uniloculaire, généralement à deux loges plus ou moins complètes par intro flexion de l'une des sutures, déhiscente ou indéhiscente. Chez certaines espèces, les graines peuvent conserver leur pouvoir germinatif pendant quarante ans (Bel-Kassaoui, 2007). Cette longue dormance est associée à la présence d'une couche dure imperméable sur les graines de plusieurs espèces du genre *Astragalus* (Long *et al.*, 2012). Bowles *et al.* (1993) ont obtenu des semences viables d'un spécimen d'herbier d'*Astragalus Neglectus* âgé de 97 ans. Malheureusement, les adaptations écologiques et les exigences de la plupart des espèces de ce genre sont encore mal connues, bien que ces connaissances soient essentielles pour la planification, la conservation et la gestion appropriées (Becker 2010). Une étude très récente réalisée par Molnar *et al.* (2015) sur *Astragalus contortuplicatus* a montré que les graines de cette espèce peuvent survivre plus de 130 ans lorsqu'elles sont stockées dans un environnement sec. Le genre d'*Astragalus* est divisé en trois séries appartenant à deux groupes A et B, selon l'épaisseur de la gousse (Ozenda, 2004 ; **Figure 6**).

Groupe A représenté par la série I : Les gousses dans ce groupe sont épaisses, renflées, dépassant un centimètre de diamètre, droite et des grandes fleurs jaunes ;

Groupe B : Les gousses de ce groupe sont étroites ne dépassant pas cinq millimètres de diamètre, droites, ou fortement arquées, et les fleurs sont de couleur variable. Les espèces appartenant à ce groupe sont divisées à leurs tours en deux séries :

- La série II : Les gousses sont arquées en demi-cercle et d'épaisseur régulière ;
- La série III : les gousses sont droites ou peu arquée, et plus ou moins dilatées.

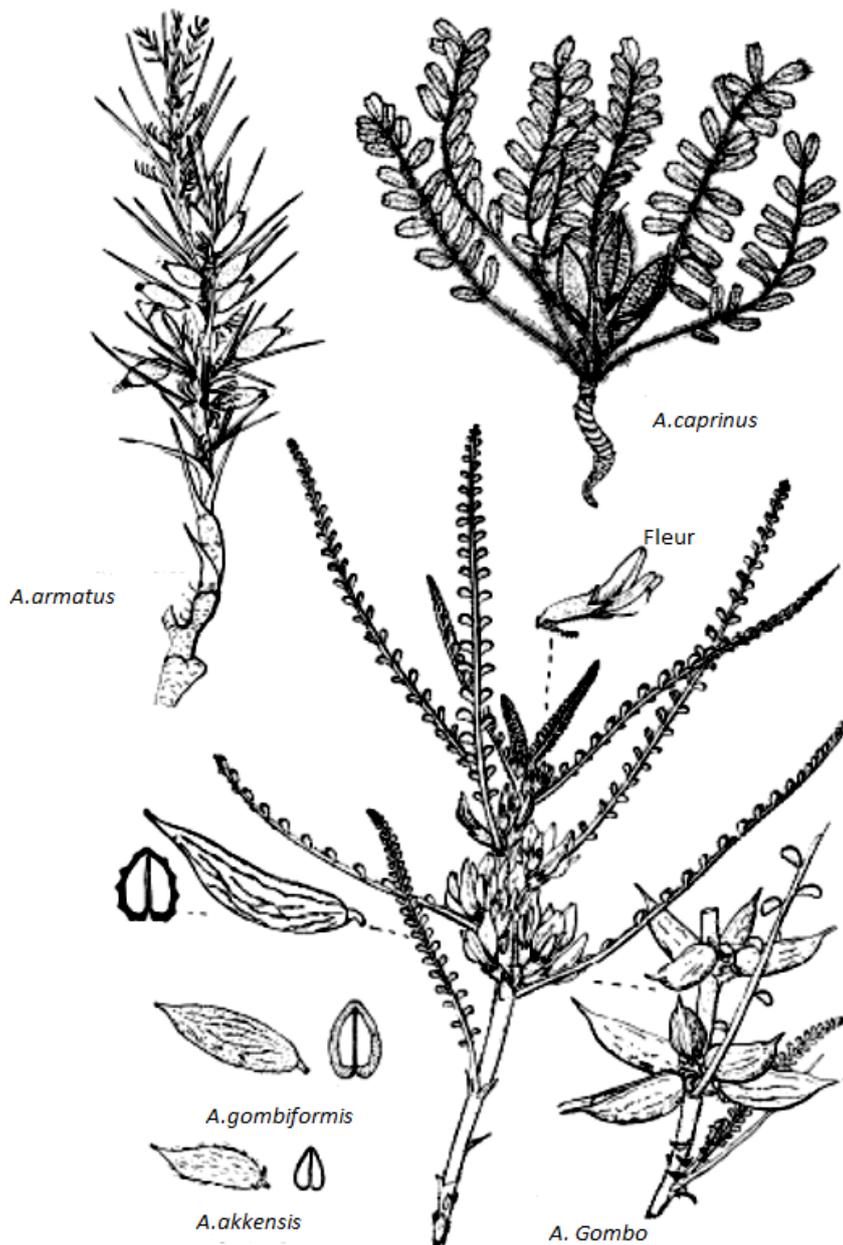


Figure 4: Quelques espèces du genre *Astragalus* présentes en Algérie (Ozenda 2004).

#### 1.1.1.1.4.1. *Astragalus gombo* Cosse et Dur

##### 1.1.1.1.4.1.1. Description botanique

L'espèce *Astragalus gombo* Cosse and Dur (Bunge) est une plante vigoureuse et basse (**Figure 5**) à port chamaephytique dont les bourgeons se situent près du sol, de 10 à 50 cm de haut, aux tiges dressées, tomenteuses (cotonneuses) recouvertes de poils épais blancs. Elles sont de couleur claire, pourvues de très longues feuilles aux nombreuses petites folioles. Les pétioles, deviennent coriaces et piquants à l'extrémité en perdant leurs folioles (Ozenda, 2004). Les fleurs papilionacées de 25 mm sont jaunes, regroupées en grappes compactes axillaires, sessiles (dépourvues de pédoncules) ou presque, insérées à l'aisselle des feuilles terminales (**Figure 4**). Comme pour toutes les espèces d'Astragale, la caractérisation du fruit

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

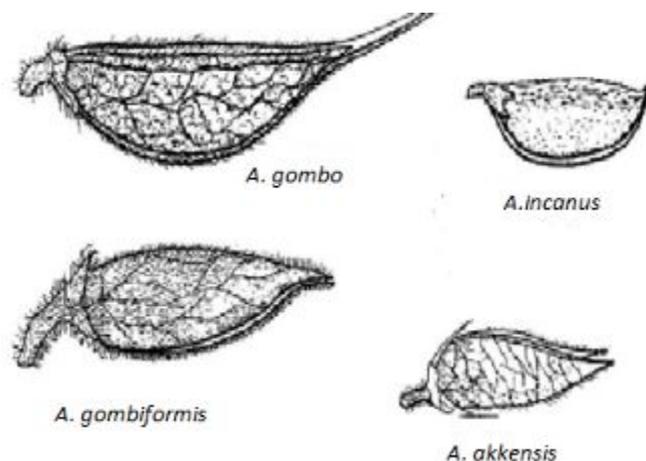
---

est déterminante. La gousse est divisée complètement en deux loges par une cloison longitudinale (**Figure 6**), à paroi épaisse, ligneuse, renflée, très dure, et couverte d'un duvet soyeux dépassant 1 cm de diamètre (Quezel, 1962 ; Ozenda, 2004). Elle a une forme saillante ornée de nervures superficielles, terminée en bec robuste.

*Astragalus gombo* est une espèce endémique saharienne (Ozenda, 2004). Elle pousse sur les plateaux calcaires ou gréseux où s'écoulent les oueds, dans les lits sablonneux, ou les éboulis de falaises. Elle forme parfois d'importants pâturages après la pluie et résiste longtemps dans certains oueds (Benchelah *et al.*, 2011). Elle est bien appréciée par les animaux, notamment, le dromadaire (Kherraze *et al.* 2010).



**Figure 5: Photographie d'*Astragalus gombo* Cosse and Dur (prise à Ouargla en 2014 par l'auteur).**



**Figure 6: Quelques gousses des plantes du genre *Astragalus* présentes en Algérie (Ozenda 2004).**

### 1.1.1.1.4.1.2. Position systématique

La classification phylogénétique, établi par l'Angiosperm Phylogeny Group (APG) définit la position systématique d'*Astragalus gombo* Bunge (APG III, 2009) :

Embranchement	Cormophytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Famille	Fabaceae
Sous famille	Papilionaceae
Tribu	Galgae
Genre	<i>Astragalus</i>
Espèce	<i>Astragalus gombo</i>

### 1.1.1.1.5. Importance économique et usages traditionnels de quelques espèces du genre *Astragalus*

Du point de vue économique et industriel, certaines espèces (*A. gummifer* Labill., *A. microcephalus* Willd, *A. strobiliferus* Royle ex Benth.) sont utilisées comme source de gomme adragante, substance largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique et dans la production de divers produits alimentaires comme les crèmes glacées, les lotions, les spiritueux et les gommes à mâcher (Gentry, 1957 ; Zarre-Mobarakeh, 2000).

### 1.1.1.1.6. Propriétés pharmacologiques et activités biologiques des espèces du genre *Astragalus*

En médecine traditionnelle chinoise, l'Astragale est considérée comme l'une des herbes les plus importantes pour le traitement des néphrites, du diabète, du cancer de l'utérus et de la leucémie. En outre, il est fréquemment utilisé comme aide culinaire (soupes, thés). Les études d'extraits de différentes espèces d'*Astragalus* ont montré une large variété d'activités biologiques permettant de les qualifier d'agentsantioxydant, diurétique, antidiabétique, hépatoprotecteur, neuroprotecteur, analgésique, un immunomodulateur, expectorant et protecteur du tractus gastro-intestinal. Certains extraits d'*Astragalus* ont également été identifiés comme des antimicrobiens, antihypertenseurs et anti-inflammatoires. Un groupe diversifié de composés pharmacologiques a été isolé des racines, des feuilles, des gousses et des graines d'*Astragalus*. Les constituants actifs déclarés comprennent les polysaccharides (et notamment les galactomannanes), les saponines, les acides aminés, les flavonoïdes, les

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

isoflavonoïdes, les alcaloïdes, les oligo-éléments, les astragalosides et les terpènes, ce qui indique le grand potentiel pharmacologique de ce genre. Le but de ce chapitre est de passer en revue les utilisations médicales et les essais cliniques réalisés avec des extraits issus d'*Astragalus*.

### 1.1.1.1.7. Utilisations médicinales des espèces du genre *Astragalus*

Les plantes appartenant au genre *Astragalus* sont traditionnellement utilisées pour leurs vertus thérapeutiques. L'Astragale est d'ailleurs décrit comme une plante de la Bible (Duke *et al.*, 2008) bien connue de Théophraste et de Dioscurides (Trease, 1983).

En médecine traditionnelle, les plantes du genre *Astragalus* sont utilisées depuis des millénaires par les Hindous et les Chinois (Chaudhary *et al.*, 2008). En Inde, la pâte de feuilles est utilisée pour réduire le taux de sucre dans le sang (Anonyme, 1985), alors que les racines sont mâchées par les femmes pour stimuler la lactation. D'autres études bibliographiques ont confirmé qu'*A. malacophyllus* Benth. ex Bunge présente des activités antituberculeuses, antitussives et de purification du sang (Verbeken *et al.*, 2003).

En médecine chinoise, les racines d'Astragales sont utilisées en décoction ou elles sont mises à mijoter dans les ragoûts de riz qui sont alors recommandés pour « dynamiser l'énergie vitale et renforcer la résistance du corps ». Ainsi, du fait de ses propriétés toniques et immunostimulantes pour le traitement du diabète et des néphrites (Chaudhary *et al.*, 2008), la racine séchée d'Astragale est utilisée avec d'autres produits d'herboristerie pour traiter la baisse de l'immunité cellulaire qui suit des traitements thérapeutiques lourds tels que la chimiothérapie (Lyons et Nambiar, 2005). Elles sont également utilisées pour la régénération des tissus, la cicatrisation des plaies et la fabrication de médicaments visant à renforcer le système immunitaire après les traitements anticancéreux (Gao *et al.*, 2001 ; McCulloch *et al.*, 2006 ; Tin *et al.*, 2007).

Toujours dans la pharmacopée chinoise, deux espèces sont plus spécifiquement répertoriées. Il s'agit d'*Astragalus membranaceus* et *Astragalus mongholicus* connus sous le nom *Radix Astragali*. Les racines décoctées de ces deux plantes sont spécifiquement utilisées pour lutter contre la transpiration excessive (l'hyperhydrose), les problèmes de miction, le prolapsus des intestins et du rectum, et également pour accélérer la guérison des brûlures et des abcès. Enfin on les utilise également comme un tonique contre la polyurie et le vertige (Tang et Eisenbrand, 1992). De même, les racines séchées d'*A. membranaceus* et *mongholicus*, ont été utilisées de longue date pour le traitement du rhume, de la diarrhée, de la fatigue et de l'anorexie depuis plus de 2000 ans (Jin *et al.*, 2014a). L'Astragale est une herbe chimiquement

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

complexe car elle contient plus de 60 composants (Duke 2003). Les principaux constituants isolés des espèces du genre *Astragalus* sont des polysaccharides, des saponines triterpénoïdes (cycloastragénol, astragaloside I à VIII et cyclocanthoside), le cycloartane triterpène et des isoflavonoïdes (Siwicka *et al.*, 2011).

Les herboristes modernes considèrent l'Astragale comme un adaptogène. Un adaptogène peut être défini comme une substance inoffensive, qui présente l'avantage de réguler les dysfonctionnements physiologiques. Les effets positifs se traduisent par une augmentation de l'endurance, une amélioration de la circulation et un plus grand équilibre de l'ensemble des organes internes (Malves, 2008).

Plus récemment, l'injection intraveineuse d'un extrait standardisé d'*Astragalus* a prouvé son efficacité comme traitement de soutien pour plusieurs problèmes de santé : cancer, divers trouble cardiaque ou hépatiques, traumatismes abdominaux graves, tuberculose, anémie aplasique (Pierre et Françoise, 2009). De même, Siwicka *et al.* (2011) ont rapporté une activité immunotrope et anti-tumorale d'un extrait de racines d'*A. membranaceus*. Les mêmes auteurs ont validé l'utilisation médicale d'un extrait de racines d'*A. membranaceus* pour le traitement des maladies cardiovasculaires en Chine. Ces travaux ont été réalisés sur des modèles *in vitro* et *in vivo* (rats). Ils ont pu mettre en évidence un effet stimulant la prolifération, la migration et la formation des cellules endothéliales et ainsi que sur la régulation de l'activité angiogénique *in vivo*. Sur un modèle de rats souffrant d'une lésion ischémique, l'extrait d'Astragale a permis l'inhibition de la fibrose cardiaque et a réduit la taille de l'infarctus. Toujours d'après cette étude, des saponines issues d'astragales (les astragaloside IV) ont exercé des effets antioxydants protecteurs vis-à-vis des acides gras libres ou de l'homocystéine, préservant ainsi les cellules endothéliales du stress oxydatif. Le même extrait d'*A. membranaceus* a montré des effets immunostimulant *in vitro* et *in vivo* se traduisant par un effet antitumoral. Les macrophages et les cellules myéloïde associées aux tumeurs étaient les plus sensibles à son activité cytostatique (Cho *et al.*, 2007). Ces cellules myeloides inhibent l'activité des lymphocytes infiltrant les tumeurs et produisent des facteurs de croissance qui favorisent la prolifération tumorale. Elles peuvent aussi produire des molécules pro-angiogéniques (Yang *et al.*, 2010).

Enfin, *Astragalus membranaceus* peut provoquer une dilatation des vaisseaux sanguins (Chen *et al.*, 2012) rendant son utilisation risquée pour les patients sous traitement anticoagulant (Paul, 2005).

Parallèlement à ces activités biologiques valorisables dans le domaine médical, de nombreux Astragales sont utilisés pour l'alimentation du bétail à l'exemple d'*A. nuttalianus*

Speg ou *A. cicer* L. (Bel-kassoui, 2007). D'autres espèces sont toxiques pour certains animaux d'élevage (bovins et ovins) et de la faune sauvage (James et Van Kampen, 1974 ; Majak et Cheng, 1983 ; El Hamidi et Leipold, 1989). Ces dernières sont classées en trois catégories selon la nature des composés toxiques qu'elles renferment (James et Shupe, 1986) :

- Les espèces accumulatrices de sélénium (James *et al.*, 1983) ;
- Les espèces productrices de produits nitrés (Ebrahimzadeh *et al.*, 1999 ; Niknam, 2002) ;
- Les espèces renfermant des alcaloïdes indolizidiques (James *et al.*, 1980 ; Cronin *et al.*, 1981).

### 1.1.1.1.8. Structure et activités biologiques des polysaccharides du genre *Astragalus*

La diversité structurale des polysaccharides, quelle que soit leur origine (animale, végétale ou microbienne), confère à ces macromolécules de nombreuses activités biologiques. Grâce à leurs propriétés interactives et régulatrices, les polysaccharides participent au contrôle de l'activité cellulaire (prolifération, différenciation, adhésion et migration) mais également à l'activité de nombreuses enzymes (Colliec *et al.*, 2004).

les recherches sur les polysaccharides des Astragales (APS) rapportée par Wang *et al.*, 1989) montre qu'il y avait un total de 24 polysaccharides isolés et identifiés à partir de la racine d'*Astragalus Membranaceus*, l'espèce d'Astragale la plus couramment utilisée dans la médecine chinoise. La phytochimie moderne et les essais pharmacologiques ont démontré que les polysaccharides d'Astragales (APS) sont des principaux ingrédients actifs. Une multitude de travaux scientifiques réalisés sur la composition en monosaccharides, la masse moléculaire, les structures ainsi les propriétés pharmacologiques de ces polysaccharides, telles que les propriétés immunomodulatrices, anti-oxydantes, anti-tumorales, antidiabétiques, antivirales, hépato-protectrices, anti-inflammatoires, anti-athéroscléroses, et neuro-protectrices sont listées dans le **Tableau 2**.

La plupart des polysaccharides d'*A. membranaceus* signalés dans le tableau suivant sont des hétéropolysaccharides. En raison de différentes matières premières ou processus de purification, différents résultats sur les caractéristiques structurales ont été donnés dans divers rapports. Ces hétéropolysaccharides ont des poids moléculaires allons de 8,7 à 4800 kDa avec un rapport différent de neuf monosaccharides, à savoir le glucose (Glc), le galactose (Gal), l'arabinose (Ara), le rhamnose (Rha), le mannose (Man), la xylose (Xyl), le fucose (Fuc), fructose (Fru) et le ribose (Rib). Comme ils pourraient également contenir de l'acide glucuronique (GlcA) et de l'acide galacturonique (GalA).

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

**Tableau 2: Structures et activités biologiques des polysaccharides isolés de la racine d'*A. membranaceus* (Jin *et al.*, 2014)**

Nom du polysaccharide	Composition en monosaccharide et ratio molaire	Masse moléculaire(Da)	Structures	Propriétés pharmacologiques
APS	Glc, Ara, Gal et Rha			Immunomodulatrice
	Glc		$\alpha$ -(1→4)-Glucane	Antioxydant et anti tumorale
APS	Glc	2,1.10 <sup>4</sup>	$\alpha$ -(1→4)-D-glucane ramifié en $\alpha$ -(1→6) chaque 10 résidus	Antioxydant et immunomodulation
APS-I	Ara: Xyl: Glc (0,54:1:18,14)	4,8 .10 <sup>6</sup>	$\alpha$ -(1→3)-glucane présentant des chaînes latérales en (1→4) et en (1→6) composées d'Ara et de Xyl	Anti tumorale
APS-II	Ara:Xyl:Glc (0,23:1:29,39)	8,7 .10 <sup>4</sup>	$\alpha$ -(1→3)-glucane présentant des chaînes latérales en (1→4) et en (1→6) composées d'Ara et de Xyl	Anti tumorale
APS	Glc	3,6.10 <sup>4</sup>	$\alpha$ -(1→4)-D-glucane ramifié en $\alpha$ -(1→6)	Anti tumorale et immunomodulation
APS-I	Glc:Gal:Ara (1,75:1,63:1)			Anti-athérosclérose et antidiabétique
APS-II	Glc	1,2.10 <sup>3</sup>	$\alpha$ -(1→4)-D-glucane	Anti-athérosclérose et antidiabétique
APS-III	Glc	3,5.10 <sup>4</sup>	$\alpha$ -(1→4)-D-glucane	Anti-athérosclérose et antidiabétique
APS	Man, Gal, Fru, Fuc, Xyl		Hétéropolysaccharide avec des liaisons en anoméries $\alpha$ et $\beta$	Antivirale et immunomodulation
Astragalane	Glc	1,5.10 <sup>4</sup>	$\alpha$ -(1→4)- Glucane	Antivirale
APS	Glc:Gal:Ara (1,75:1,63:1)	3,6.10 <sup>4</sup>		Hépatoprotectrice
APS	Glc	3,6.10 <sup>4</sup>	$\alpha$ -(1→4)-D-glucane ramifié en $\alpha$ -(1→6) - tous les neuf résidus	Protection rénale
APS	Rha:Glc:Gal:Ara (1,19:72,01:5,85:20,95)	1,1.10 <sup>4</sup>		Anti-inflammatoire
AMon-S	Ara:Gal:GalA:GlcA (18:18:1:1)	7,6.10 <sup>4</sup>	$\alpha$ -(1→5)-L-arabinane ramifié en $\beta$ -(3→6)-D-galactane	Reticuloendothelial fortifiant
F-8	Rha:Rib:Fuc:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc (2:2:1:2:6:2:3:100)	2,2.10 <sup>4</sup>		Immunomodulation
F-9	Fuc:Xyl:Glc (1:2:100)	1,2.10 <sup>4</sup>		Immunomodulation
APS	Rha:Xyl:Glc:Gal:Man:Fru (4,9:4.7:8.3:12,2:2,2:3,1)	3,6.10 <sup>4</sup>		Immunomodulation
APSID3	Ara: Rha:Gal:Glc (2:2:5:6)	1,7.10 <sup>5</sup>	unité de répétition composée d'un Ara terminal, d'un Ara lié en (1→5), d'un Rha lié en (1→3), d'un Rha lié en (1→3) et en (1→4), de six GlcA liées en (1→4) et de cinq résidus GalA liés en (1→4)	
APS-I	Ara: Glc (1: 3,45)	5,8.10 <sup>6</sup>		
APS-II	Rha:Ara:Glc (1:6,25:17,86)	1,2.10 <sup>6</sup>		
APS	Ara:Man:Glc:Gal (0,10:1,26:1:0,01)			Antioxydant
APS		6,9.10 <sup>6</sup>		Immunomodulation
APS	Rha: Xyl:Glc:Gal (1:4:5:1,5)	3,0.10 <sup>4</sup>	$\beta$ -(1,3)-D-Galactane avec insertion de $\beta$ -Glc, d' $\alpha$ -Gal lié en (1→6), de $\beta$ -Xyl lié en (1→5), de $\beta$ -Gal lié par (1→4) Gal, $\alpha$ -Rha lié en (1→2), résidus $\alpha$ -Rha liés en (1→4) et en (1→2)	

Source (Jin *et al.*, 2014)

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

En outre, certaines données structurales et conformationnelles sur ces hétéropolysaccharides ont été rapportées par Wang *et al.* (2006). Ces auteurs ont constaté que l'unité de répétition de la chaîne secondaire d'un hétéropolysaccharide hydrosoluble (APSID3) isolé d'*A. membranaceus* (**Tableau 2**) est composée d'un Ara terminal, d'un Ara lié en (1→5), d'un Rha lié en (1→3), d'un Rha lié en (1→3) et en (1→4), de six GlcA liées en (1→4) et de cinq résidus GalA liés en (1→4). Par contre la chaîne principale est composée de GalA lié en (1→4), de GlcA lié en (1→4) et d'une petite quantité de Rha liée en (1→3) avec une chaîne latérale composée de petites chaînes d'Ara liée en (1→5), liée à son tour en C-4 avec de Rha en (1→3).

Une autre analyse structurale effectuée par Zhu *et al.* (2011) de deux polysaccharides isolés de *A. membranaceus* à l'aide de précipitations fractionnées, par chromatographie sur colonne DEAE-Sephadex A-25 et Sephadex G-100 a indiqué que leurs chaînes principales sont composées de  $\alpha$ -(1→3)-glucane présentant des chaînes latérales en (1→4) et en (1→6) composées d'Ara et de Xyl. Récemment, Fu *et al.* (2013) ont rapporté que l'APS avait un squelette linéaire composé principalement de résidus de type  $\beta$ -(1→3)-D-Galactane (**Tableau 2**) avec une insertion de  $\beta$ -Glc, d' $\alpha$ -Gal lié en (1→6), de  $\beta$ -Xyl lié en (1→5), de  $\beta$ -Gal lié par (1→4) Gal,  $\alpha$ -Rha lié en (1→2), et des résidus  $\alpha$ -Rha liés en (1→4) et en (1→2). De plus, certains glucanes ont également été isolés et purifiés à partir d'*A. membranaceus* à l'exception des hétéropolysaccharides mentionnés ci-dessus. Ces glucanes ont été principalement déterminés sous forme de  $\alpha$ -(1→4)-D-glucane avec des poids moléculaires allant de 12 à 36 kDa. Li et Zhang (2007) ont étudié la structure primaire d'un polysaccharide hydrosoluble extrait de la racine d'*A. membranaceus* et ils ont constaté que ce polysaccharide est un  $\alpha$ -(1→4)-D-glucane, ramifié en  $\alpha$ -(1→6) tous les neuf résidus en moyenne, le long de la chaîne principale, avec un seul  $\alpha$ -D-Glc au C-6. Li *et al.* (2009) ont rapporté que ce polysaccharide d'*A. membranaceus* présente des propriétés anti tumorales.

### 1.1.1.1.8.1. Activité antioxydante

Le vieillissement est un phénomène complexe qui entraîne une augmentation de l'incapacité fonctionnelle, une diminution de la capacité à survivre au stress et une probabilité croissante de décès (Datta *et al.*, 2011). En tant que facteur causal important dans le processus de vieillissement, le radical superoxyde  $O_2^-$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , qualifiés espèces réactives de l'oxygène peuvent conduire à des mutations dans l'ADN et à des lésions de composants mitochondriaux conduisant à la sénescence (Gardes *et al.*, 2003).

Les activités antioxydantes des polysaccharides d'Astragales ont été largement étudiées *in*

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

---

*vitro*. Les résultats ont indiqué que l'APS possède de puissantes propriétés de piégeage des radicaux libres, et un effet chélateur sur les ions ferreux proportionnel à leur concentration (Li *et al.*, 2010). *In vitro* l'APS peut inhiber la production de substances réactives à l'acide thiobarbiturique et protéger les mitochondries de la transition de perméabilité induite par la surcharge en calcium (Li *et al.*, 2012). Sur un modèle *in vivo* (souris), l'administration d'un régime alimentaire supplémenté d'APS (160 mg/kg de poids corporel) pendant 30 jours a augmenté de façon significative les activités des enzymes antioxydantes telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px). Ce régime alimentaire a également conduit à une diminution de la teneur en malondialdéhyde (MDA) et la peroxydation lipidique dans le sérum et le foie des animaux traités (Yan *et al.*, 2010). Toujours avec un modèle murin *in vivo*, Li *et al.* (2012) ont étudié l'activité antiviellissement de l'APS. Des injections sous cutanées de 100 mg/kg/jour pendant 7 semaines de D-Gal ont induit le vieillissement des animaux. L'administration d'APS par gavage oral à la dose de 200 et 300 mg/kg/jour a significativement augmenté les activités SOD, CAT, GSH-Px et radical anti-hydroxyl dans le foie de ces souris vieillissantes démontrant ainsi ses effets protecteurs. Enfin, Boual *et al.* (2015) ont signalé l'activité antioxydante d'un galactomanane issu de graines d'*A. armatus*.

### **1.1.1.1.8.2. Activité immunomodulatrice**

Les composés qui sont capables d'interagir avec le système immunitaire pour réguler positivement ou négativement la réponse de l'hôte face à du non soi peuvent être classés comme des immunomodulateurs ou des modificateurs de la réponse immunitaire (Tzianabos, 2000). De nombreuses études ont démontré que les APS possèdent des effets immunomodulateurs forts à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les lymphocytes jouent un rôle crucial dans la cascade d'activation de ces réponses cellulaires et immunitaires immunes (Jin *et al.*, 2010). Ainsi, l'APS à favoriser la prolifération des lymphocytes T positifs dans le sang périphérique c'est-à-dire hors de la moelle osseuse des poussins (Li *et al.* 2009). Par ailleurs, l'APS peut améliorer les expressions de certaines cytokines telles que l'interleukine (IL -1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) dans le rein et la rate de la carpe commune (Yuan *et al.*, 2008). L'APS a également augmenté les niveaux d'IL-2 ou d'interféron (IFN) sériques chez des porcs sevrés (Yuan *et al.*, 2006). Enfin, Lee *et al.* (2005) rapportent que l'extrait racinaire de *Radix astragali* module la réponse module la réponse immunitaire en régulant l'expression des IL-1 et IL-6 ainsi que l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Cette dernière génère de l'oxyde nitrique (NO) à l'origine du microbicide indépendante de l'oxygène. Les cytokines

qui sont des protéines qui participent à de nombreux processus physiologiques, et notamment à l'initiation et à la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives sont donc fortement modulées par les polysaccharides d'*Astragales* (Jin *et al.*, 2014).

### 1.1.1.1.8.3. Activités anti tumorale et anticancéreuse

Le cancer est un problème universel de santé associé à une forte morbidité et mortalité (Bao *et al.*, 2013). C'est une maladie multifactorielle complexe typiquement caractérisée par une croissance incontrôlée de cellules transformées (Wang *et al.*, 2014), qui tendent à envahir les tissus environnants et à métastaser vers d'autres tissus et organes (Zong *et al.*, 2012). Cette pathologie est décrite comme un ensemble hétérogène de cellules qui se développent dans des microenvironnements tumoraux dont l'écologie est complexe. La progression rapide des cancers humains, est liée à l'évasion des mécanismes de surveillance immunitaire de l'organisme par les cellules tumorales ainsi que par la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs qui modifient la réponse immunitaire de l'hôte (Joseph *et al.*, 2014).

Les traitements anticancéreux classiques, comme la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, montrent leurs limites en raison de mauvais pronostics et d'effets secondaires graves. De nos jours, une attention croissante se porte sur les produits d'origine naturel pour rechercher de nouveaux agents anticancéreux efficaces et moins toxiques (Bao *et al.*, 2013).

De nombreuses études ont suggéré que les polysaccharides peuvent inhiber la croissance tumorale par des mécanismes communs. Ainsi, la consommation orale de préparations actives peut générer une activité anticancéreuse directe par des mécanismes tels que l'induction de l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) des cellules tumorales ; la potentialisation de l'activité immunitaire associée à une chimiothérapie et l'inhibition de la capacité des tumeurs à former des métastases (Zong *et al.*, 2012). Les polysaccharides antitumoraux sont souvent de type  $\beta$ -(1→3)-glucanes variablement ramifiés en  $\beta$ -(1→6) par des résidus glucose. Les  $\beta$ -glucanes contenant majoritairement des liaisons osidiques de type (1→6), présentent moins d'activité. Certains auteurs expliquent ce phénomène par la plus grande flexibilité de ces glucanes. A noter que les polysaccharides antitumoraux peuvent avoir d'autres structures de type hétéro- $\beta$ -glucanes, hétéroglucane,  $\beta$ -glucane-protéine,  $\alpha$ -manno- $\beta$ -glucane,  $\alpha$ -glucane-protéine et des complexes hétéroglycane-protéine (Zhang *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, des polysaccharides d'*Astragalus membranaceus* se sont révélés capables d'augmenter la sensibilité des chimiothérapies, en réduisant les effets secondaires et les complications ce qui s'est traduit par un meilleur confort de vie des patients et un allongement de leur durée de vie (Tian *et al.*, 2012). La formation de cellules tumorales peut être induite

directement par l'immunosuppression et la présence de radicaux libres (Wijesekara *et al.*, 2011). Par conséquent, des agents d'élimination des radicaux et des immunomodulateurs tels que l'APS peuvent être utilisés pour réduire la formation de tumeurs dans le corps humain. Zhu *et al.*, (2011) ont isolé et purifié deux nouveaux polysaccharides, APS-I et APS-II, de l'APS en utilisant la précipitation fractionnée, La chromatographie d'échange d'ions (DEAE) et la chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Sephadex G-100. Ils signalent que les taux d'inhibition de l'APS-I et de l'APS-II pour l'hépatome sont respectivement de 55,4 % et 47,72 %. De même, l'APS-I et l'APS-II ont protégé le foie, la rate et le thymus de souris injectés avec des cellules d'hépatome (H22). Tian *et al.* (2012) ont montré que cet effet antitumoral de l'APS chez les souris porteuses de tumeurs H22, pourrait être lié à sa capacité à augmenter l'expression des interleukines IL-1, IL-2, IL-6 et TNF- $\alpha$ , à diminuer l'IL-10, et de diminuer l'expression de la résistance multiple aux médicaments (MDR), et leurs capacité d'inhiber la fonction de pompage de la glycoprotéine P. L'APS peut ainsi inhiber de façon significative la croissance et le développement du cancer de l'estomac et stimuler les fonctions immunitaires *in vivo* (Li *et al.*, 2009).

#### 1.1.1.1.8.4. Activités anti diabétiques et hypoglycémiantes

Le *diabetes mellitus* ou diabète sucré (ou *diabète* par abus de langage) est dû à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie menant à une hyperglycémie. Cette maladie métabolique chronique grave touche environ 4 % de la population mondiale et devrait augmenter à 5,4 % en 2025 (Dahech *et al.*, 2011). La résistance à l'insuline, précurseur de base du diabète de type 2 (DM2), est une maladie polygénique chez environ 90 % des patients diabétiques. De nombreux facteurs peuvent provoquer une résistance à l'insuline et conduire ainsi au diabète, tels que le dysfonctionnement des cellules, une altération de l'utilisation du glucose dans les muscles squelettiques, des troubles du métabolisme des acides gras et des lipides, une augmentation de la gluconéogenèse hépatique et une diminution de la perfusion microvasculaire. Bien que les médicaments hypoglycémiantes classiques aient une bonne efficacité, leur coût élevé et la présence d'effets secondaires ont limité leurs applications cliniques. De nos jours, l'attention se porte également sur la prévention et sur l'extraction de polysaccharides présentant des activités antidiabétiques (Zhu *et al.*, 2014). Les effets antidiabétiques de l'APS ont été étudiés par plusieurs équipes. Le traitement par l'APS pendant 8 semaines améliore les symptômes du diabète, y compris les cheveux bruns, la polyurie, la polydipsie, la léthargie, l'inactivité physique, la perte de poids corporel, la cyphose et la position en décubitus chez des rats diabétiques de type Sprague-Dawley (SD)

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

induits par la streptozotocine. Il peut également diminuer les niveaux de glucose sanguin, de lipides plasmatiques et de microalbuminurie (Zhang *et al.*, 2007). De la même manière, certaines études effectuées sur des rats diabétiques (traités à la streptozotocine) ont révélé que le traitement par l'APS fournis dans leurs alimentation pouvait diminuer significativement le poids corporel et la glycémie plasmatique, et améliorer la sensibilité à l'insuline (Lu *et al.*, 2013). Enfin, des polysaccharides isolés à partir des genres *Astragalus*, de la famille Pleurotaceae (Kong, 2004) et du Yacon *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) (Baroni *et al.*, 2008) ont montré des effets inhibiteurs sur l' $\alpha$ -glucosidase intestinale. L' $\alpha$ -glucosidase intestinale libère du glucose à partir de substrats tels que le maltose, le saccharose, et d'autres oligosaccharides dans l'intestin. L'inhibition de cette enzyme permet donc de ralentir la production et l'absorption de glucose (Zhu *et al.*, 2014). Les résultats obtenus par Zhu *et al.* (2014) ont montré que le pourcentage de l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase par les polysaccharides d'*Astragalus* et de pleurotes étaient de plus de 40% à une concentration de polysaccharide de 0,4 mg/mL. La concentration inhibitrice médiane (CI<sub>50</sub>) des polysaccharides d'*Astragalus* et de Pleurotes étaient de 0,28 et 0,42 mg/mL, respectivement. En raison de la glycémie constamment élevée, les personnes atteintes de diabète ont un risque accru de développer un certain nombre de complications graves qui affectent le cœur, les vaisseaux sanguins, les reins, les yeux, les nerfs et les dents (Chen *et al.*, 2010). Les mêmes auteurs, rapportent que les APS peuvent maintenir la glycémie, la pression artérielle et le cholestérol à un niveau proche du niveau normal. Ils suggèrent que les APS peuvent prévenir le développement de certaines complications diabétiques et peuvent être utilisés comme des agents potentiels pour la cardiomyopathie diabétique. Cette dernière est l'une des insuffisances cardiaques chroniques plus courantes avec une morbidité et une mortalité élevées. Les mêmes auteurs ont également mis en évidence en 2012 que l'APS diminue de manière significative les taux de lipides dans le sang et améliore les troubles du métabolisme lipidique chez les hamsters diabétiques. L'hyperlipidémie au cours du diabète est l'une des principales causes de maladies cardiovasculaires, et un des déterminants majeurs du statut du diabète (Jin *et al.*, 2012). Zhang *et al.* (2007) ont également étudié l'effet de l'APS sur la néphropathie diabétique chez les rats diabétiques SD induits par la streptozotocine. Ils signalent que l'APS réduit le rapport du poids du rein sur le poids corporel, donc améliore la fonction rénale chez ces animaux. Ils rapportent que l'APS a un effet prophylactique et thérapeutique sur les progrès de la néphropathie diabétique.

### 1.1.1.1.8.5. Activité hépato-protective

Une infection virale, un trouble métabolique, un déséquilibre immunologique, une mauvaise élimination des toxines et une lésion ischémique peuvent entraîner une lésion aiguë des hépatocytes, entraînant une perte fonctionnelle de 80-90 % des cellules hépatiques en 1 à 4 semaines (Jin *et al.*, 2013). Le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>), un agent hépatotoxique bien connu, a été largement utilisé pour établir des modèles d'insuffisance hépatique pour le dépistage des médicaments hépatoprotecteurs (Olusola *et al.*, 2015). Yan *et al.* (2009) ont étudié les effets synaptiques hépatoprotecteurs de l'APS sur la lésion hépatique chronique induite par la CCl<sub>4</sub> chez les rats SD mâles. Les rats ont été traités par injection sous-cutanée de CCl<sub>4</sub> dans de l'huile d'arachide (1:9) à la dose de 5 mL/kg deux fois par semaine et traités avec de l'APS (450 mg/kg/jour) mélangé à leur alimentation pendant 3 mois. Les auteurs ont constaté que l'APS diminue de manière significative les taux sériques d'alanine aminotransférase (ALT), d'aspartate aminotransférase (AST) et de phosphatase alcaline (ALP), et améliore l'activité de SOD dans le foie. Dang *et al.* (2008) signalent également que l'APS fournit des effets protecteurs significatifs contre la lésion hépatique chronique induite par la CCl<sub>4</sub>. Jia *et al.* (2011) ont évalué les effets hépatoprotecteurs de l'APS sur les lésions hépatocytaires induites par le CCl<sub>4</sub> chez la carpe commune. Ils ont pu mettre en évidence que l'APS, à des concentrations de 200, 400 et 800 µg/mL, améliore la viabilité cellulaire, augmente le taux de SOD et inhibe la glutamate pyruvate transaminase (GPT), la glutamate oxalate transaminase (GOT), la lactate déshydrogénase (LDH) et le taux de malondialdéhyde (MDA). Ces résultats indiquent que les effets hépatoprotecteurs de l'APS pourraient être liés à ses activités antioxydantes. L'APS pourrait donc être utilisé comme agent hépatoprotecteur et antioxydant pour le traitement des troubles du foie et de la vésicule biliaire.

### 1.1.1.1.8.6. Activité anti-inflammatoire

Un effet anti-inflammatoire a été observé *in vivo* par Li *et al.*, (2007) chez les rats Wistar mâles nourris avec de l'APS constitué d'une chaîne de type glucane et de masse moléculaire de  $3,6 \cdot 10^4$  Da vis-à-vis de la glomérulonéphrite induite par l'albumine de sérum bovin cationique (C-BSA) selon la méthode de Border *et al.* (1982). Rappelons que la glomérulonéphrite est une affection rénale progressive touchant les glomérules du rein. Lorsque les glomérules rénaux sont enflammés on assiste à une accumulation de liquide et de toxines dans l'organisme. La glomérulonéphrite peut entraîner une insuffisance rénale chronique. L'effet de l'APS sur la glomérulonéphrite induite par la C-BSA a été évalué par cytométrie de flux en utilisant le facteur de transcription nucléaire-κB (NF-κB) comme

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

---

marqueur. L'IL-2, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  ont été déterminés par la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Le C-BSA augmente les niveaux de toutes les cytokines et réduit les concentrations de IL-2, IL-6 et de TNF- $\alpha$  dans le plasma. Pendant ce temps, l'APS a diminué de façon significative la protéinurie et les changements morphologiques induits par la C-BSA, ce qui indique que l'APS pourrait être utilisé comme agent thérapeutique pour la glomérulonéphrite (Han 2013). L'APS a également montré des effets thérapeutiques sur l'arthrite induite par adjuvant (AA) chez les rats Wistar mâles (Jiang *et al.*, 2010). IL a ainsi été trouvé que le traitement avec l'APS peut réduire l'accumulation cellulaire, le gonflement des articulations et les concentrations sériques de TNF-1 et IL-1 de manière dépendante chez les rats atteints d'arthrite induite par adjuvant (AA).

L'APS a également montré des effets thérapeutiques dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes (Jin *et al.*, 2014a). Les études *in vitro* de Han (2013), ont prouvé que l'APS possède un effet inhibiteur sur l'inflammation induite par les LPS bactériens et du palmitate. Zheng *et al.* (2013) rapportent que l'APS peut inhiber la perméabilité accrue induite par une protéine constitutive de la chromatine (HMGB1- high-mobility group box 1) et qui joue un rôle important dans l'activité anti-inflammatoire de l'APS dans les cellules endothéliales par les voies de signal Rho / ROCK. Enfin, Yang *et al.* (2014) ont démontré que les polysaccharides d'*Astragalus membranaceus* améliorent significativement la colite et peuvent être utilisées comme agent thérapeutique novateur pour les maladies intestinales inflammatoires.

### **1.1.1.1.8.7. Activité anti-athérosclérose**

L'athérosclérose est une réaction inflammatoire dans la paroi artérielle, initiée par la rétention des lipides (Wang *et al.*, 2010). Certaines études ont indiqué que le TNF- $\alpha$  pouvait réguler à la baisse l'expression du transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette 1), qui joue un rôle vital dans le transport du cholestérol et détermine le processus d'athérosclérose (Mei *et al.*, 2007). Un traitement des patients par de l'APS pourrait significativement favoriser l'expression d'ABCA1, augmenter le taux d'effluent de cholestérol et diminuer la teneur en cholestérol total dans les cellules spumeuses dérivées de macrophages THP-1 exposées au TNF- $\alpha$ . En outre, l'APS pourrait réduire l'augmentation du facteur de transcription nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dans les cellules spumeuses induite par TNF- $\alpha$  (Wang *et al.*, 2010). L'hypercholestérolémie étant un facteur contribuant à l'athérosclérose, certaines études ont été menées pour déterminer l'efficacité de l'APS sur la réduction des lipides plasmatiques chez les hamsters hypercholestérolémiques suite à un régime alimentaire riche en matières grasses (Cheng *et al.*,

2011). Il a été constaté que le traitement avec l'APS pendant 3 mois a significativement abaissé le cholestérol plasmatique total de 45,8 %, les triglycérides de 30 % et le cholestérol-LDL de 47,4 %. Ces résultats suggèrent que l'APS pourrait être utilisée comme agent hypocholestérolémiant naturel dans le traitement de l'hyperlipidémie, de l'athérosclérose ou de la maladie coronarienne.

### **1.1.1.1.8.8. Activité antivirale**

L'hépatite B causée par le virus de l'hépatite B (VHB) est la principale cause de cirrhose et de cancer du foie. C'est une maladie infectieuse inflammatoire. La stratégie actuelle de traitement de l'hépatite B est de diminuer la charge virale à l'aide de médicaments antiviraux comme l'interféron et la lamivudine (Palumbo, 2008). Cependant, l'utilisation de ces médicaments est presque toujours associée à des effets secondaires, à une faible activité antivirale et à une longue période de traitement (Keeffe *et al.*, 2008). Afin d'explorer de nouveaux agents antiviraux naturels, les effets inhibiteurs de l'APS sur la réplication du VHB ont été étudiés par Dang *et al.* (2009). Ces auteurs ont mis en évidence que l'administration d'emodine et d'APS (57,59 et 287,95 mg/kg/jour, respectivement) a significativement réduit les niveaux d'ADN du VHB dans le sérum de souris transgéniques. De plus, une réduction de la teneur en antigène de surface du virus de l'hépatite B, a aussi été observée sur ces souris traitées permettant de conclure sur l'effet inhibiteur de l'APS vis-à-vis de la réplication du VHB.

La bursite infectieuse, causée par le virus de la bursite infectieuse (IBDV), est une maladie très contagieuse caractérisée par l'immunosuppression et la mortalité des jeunes poulets. Elle est responsable de pertes économiques importantes pour la filière avicole. Jiang *et al.* (2010) ont étudié l'effet de l'APS sur la fonction immunologique des érythrocytes chez les poulets infectés par l'IBDV. Ils ont découvert que l'APS améliorait nettement le taux de formation de la rosette érythrocytaire, ce qui suggère que l'APS améliore la fonction immunologique du poulet infecté par IBDV.

### **1.1.1.1.9. Intoxication par les Astragales**

En général, l'Astragale est considéré comme une plante non toxique qui a été utilisée pendant de nombreux siècles sans révéler d'effets indésirables majeurs. Les études réalisées jusqu'à ce jour sur des animaux n'ont pas révélé de toxicité significative. En effet, des doses pouvant aller jusqu'à 40 g/kg administrées à des rats par voie intrapéritonéale n'ont pas conduit à l'apparition d'effets indésirables. C'est l'équivalent de 70 fois la dose généralement consommée par l'homme lors de pratiques thérapeutiques (Yu *et al.*, 2007). Cependant

plusieurs espèces d'Astragale, tels que *A. lentiginosus* et *A. lusitanicus*, sont connues pour être toxiques pour le bétail, avec des cas d'empoisonnements signalés. Ces espèces sont appelées locoweed ou milkvetch, et ne sont pas utilisées dans la médecine traditionnelle (Cho, 2011). L'intoxication par les espèces du genre *Astragalus* a été évoquée par plusieurs études. Cette toxicité est due à la présence de composés nitroaliphatiques et à l'accumulation du sélénium (Rios et Waterman, 1997). Elle a été décrite pour la première fois chez le mouton en 1873 dans l'ouest des Etats Unis (James, 1972) puis dans d'autres pays du monde tels que le Canada, l'Australie, l'Espagne et le Maroc (El Hamidi et Leipold, 1989). Aux Etats Unis, et dans les années 70 les espèces toxiques du genre *Astragalus* occupaient le premier rang dans les pertes annuelles causées par les intoxications d'origine végétale qui étaient estimées à 107 Millions/année de dollars par an dans les années 1970 (Nielson, 1978).

### 1.2. Généralités sur les polysaccharides

Les glucides ou saccharides sont les molécules biologiques les plus abondantes. Leur formule brute générale  $(CH_2O)_n$  leur a valu le nom d'hydrates de carbone ou carbohydrates pour les anglo-saxons. Les unités de base des glucides sont appelés monosaccharides ou oses. Ce sont des polyhydroxyaldéhydes ou des polyhydroxycétones contenant entre 3 et 7 atomes de carbone. Les osides sont des polymères d'oses liés entre eux par des liaisons de type *O*-glycosidique. Ces derniers sont classés en deux catégories en fonction de leur degré de polymérisation (dp) : Les polysaccharides (polyholosides ou polysosides ou glycanes) dont le dp est supérieur à 10.

Les glucides sont présents chez les procaryotes et eucaryotes et sont synthétisés par gluconéogenèse, ou photosynthèse. Ils sont parfois liés de manière covalente à des protéines (glycoprotéines) ou des lipides (glycolipides) et jouent un rôle très important dans leur fonctionnalisation et/ou leur adressage. La diversité structurale et fonctionnelle des glucides leur confère des propriétés physico-chimiques et biologiques extrêmement variées. Par conséquent, la résolution des structures et la compréhension fine des mécanismes dans lesquels ils sont impliqués constituent un challenge pour la glycobiologie. Ces avancées dans la résolution des structures de glucides complexes et la compréhension de leurs fonctions sont rendues possible grâce aux progrès réalisés par les outils analytiques (RMN, GC/LC-MS, HPLC, HPAEC et FTIR).

### 1.2.1. Les Polysaccharides

Les polysaccharides, également nommés glycanes, sont des polymères condensés composés de longues chaînes d'unités monosaccharidiques. Leur hydrolyse complète en utilisant des acides ou des enzymes spécifiques, libère leurs monosaccharides ou oligosaccharides constitutifs. Les polysaccharides peuvent être linéaires (cellulose), substitués (galactomannanes), ou ramifiés (gomme arabique). Les polysaccharides ramifiés peuvent posséder différents degrés de ramification, c'est-à-dire peu branchés, avec des ramifications régulièrement ou irrégulièrement espacées, courtes ou longues (Di Donato *et al.*, 2015). Leurs rôles principaux dans l'organisme est de stocker de l'énergie (tels que l'amidon ou le glycogène) ou de fournir un soutien structurel (cellulose ou chitine). Enfin, certains poly- et oligosaccharides peuvent être impliqués dans des processus de communication cellulaire (reconnaissance structurale, régulation de fonctions métaboliques, et mécanismes de défense). Ils sont très largement constitués d'hexoses et de pentoses. Le D-glucose est le monosaccharide prédominant dans les polysaccharides bien que le D-fructose, le D- et le L-galactose, le D-xylose et le L-arabinose sont également présents. Certains dérivés de monosaccharides peuvent également être trouvés comme produits d'hydrolyse de polysaccharides naturels. C'est le cas de la D-glucosamine, de la D-galactosamine, de l'acide D-glucuronique, de l'acide N-acétyl-neuraminique et de l'acide N-acétyl-muramique.

Selon leur composition en monosaccharides, les polysaccharides peuvent être divisés en deux classes : les homopolysaccharides contenant un seul type de monosaccharide (**Tableau 3**) et les hétéropolysaccharides, contenant deux ou plusieurs unités monosaccharidiques différentes. A titre d'exemple on peut citer les galactomannanes constitués de galactose et de mannose (Izydorzyc *et al.*, 2005).

A noter que la présence de groupements non sucre tels que des sulfates ou certains acides organiques sur ces structures peut encore augmenter leur complexité structurale. Dans ces polymères, les monosaccharides sont liés par des liaisons glycosidiques entre l'hydroxyle du carbone anomérique d'un ose et n'importe lequel des hydroxyles d'un autre ose. Les liaisons glycosidiques qui unissent les monosaccharides peuvent avoir des configurations  $\alpha$  ou  $\beta$ . En termes de nomenclature les polysaccharides sont nommés par le monosaccharide majoritaire suivi du suffixe « ane » comme dans le cas des glucanes (glucose) ou des xylanes (xylose). Si plusieurs monosaccharides différents sont présents dans la structure de ces macromolécules alors on associe le second voir le troisième monosaccharide (en termes de représentation) avec la même nomenclature (ex des galactomannanes ou des glucuronoarabinoxylanes).

Tableau 3: Principaux homopolysaccharides naturels (Ramawat et Merillon 2015)

Type	Unité de répétition	
	Polysaccharide	Liaison Glycosidique /Monosaccharide
Linaire	Amylose	$\alpha$ -(1→4)-Glc
	Cellulose	$\beta$ -(1→4)-Glc
	Xylane	$\beta$ -(1→4)-Xyl
	Inuline	$\beta$ -(2→1)-Fru
	Levane	$\beta$ -(2→6)-Fru
	Laminarine	$\beta$ -(1→3)-Glc
	Chitine	$\beta$ -(1→4)-Glc-N-Ac
	$\beta$ -Glucane	$\beta$ -(1→4, 1→3)-Glc
	Curdlane	$\beta$ -(1→3)-Glc
	Ramifié	Amylopectine
Dextrane		$\alpha$ -(1→2, 1→3, 1→4, 1→6)-Glc
Levane		$\alpha$ -(2→1, 2→6)-Fru
Pullulane		$\alpha$ -(1→6)-maltotriose
Scleroglucane		$\alpha$ -(1→3, 1→6)-Glc
Glycogene		$\alpha$ -(1→4, 1→6)-Glc
Lentinane		$\beta$ -(1→3, 1→6)-Glc
Grifolane		$\beta$ -(1→3, 1→6)-Glc
Schizophyllane		$\beta$ -(1→3, 1→6)-Glc

Les polysaccharides diffèrent les uns des autres dans leurs unités monosaccharidiques répétées (**Tableau 3**), la longueur de leurs chaînes et le degré de ramification. A l'exception des polysaccharides cycliques connus sous le nom de cyclodextrines, leurs chaînes ont une extrémité non réductrice et une extrémité réductrice. La formule générale des polysaccharides est  $C_x(H_2O)_n$ , où x est habituellement un nombre entre 200 et 2500 (Zong *et al.*, 2012). Considérant que les motifs répétitifs dans le squelette du polymère sont souvent des monosaccharides à six atomes de carbone, la formule générale peut également être représentée par  $(C_6H_{10}O_5)_n$  où  $40 \leq n \leq 3000$  (Zong *et al.*, 2012).

Dans un échantillon de polysaccharide, toutes les molécules n'ont pas la même masse moléculaire et il existe une masse moléculaire moyenne représentative de la distribution des masses moléculaires. Les polysaccharides sont des molécules de taille importante (100 à 500 nm) par rapport aux molécules organiques simples (quelques Å à 10 nm) (Colonna et Thibault 1986), ce qui implique des masses moléculaires élevées, de l'ordre de  $10^6$  g/mol. Si l'on ajoute à cela leur capacité à établir de nombreuses interactions inter- et intramoléculaires, les polysaccharides ont la capacité d'augmenter considérablement la viscosité des solutions qui les contiennent par rapport à celle du solvant pur. Ils sont largement utilisés comme texturant dans de nombreuses applications biomédicales, pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques. Une large gamme de polysaccharides a déjà trouvé des applications dans la

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

santé humaine. A titre d'exemple on peut citer le chitosane (le seul polysaccharide connu présentant un caractère cationique), la cellulose, les alginates, le dextrane, l'amidon, l'acide hyaluronique, l'héparine, le  $\kappa$ -carrageenan, les pectines et la gomme de guar (Persin *et al.*, 2011). En effet, la plupart de ces biopolymères sont non toxiques, biocompatibles, biodégradables et hydrosolubles à l'exception de la plupart des polysaccharides structurels tels que la chitine et la cellulose.

Les polysaccharides peuvent être classés sur la base de leur structure, leur solubilité, leurs sources, leurs rôles biologiques et leurs applications.

Leurs propriétés biologiques et physico-chimiques (**Tableau 4**) seront fortement dépendantes de leurs structures à savoir le(s) type(s) de monosaccharide(s) constitutif(s), la présence de groupements non sucres chargés ou neutres et le type de liaisons glycosidiques.

**Tableau 4: Effets des composants des polysaccharides sur leurs propriétés physico-chimiques.**

Caractéristique	Effet	Propriétés résultantes	Exemple
Oses neutres	Neutralité	Insolubilité	Cellulose
Oses acides	Caractère anionique	Solubilité, interactions ioniques	Xanthane, Alginate
Pyruvate	Caractère anionique	Interactions ioniques	Succinoglycane
Acétylation	Hydrophobicité, Solubilité	Diminue la capacité de gélification et les interactions ioniques	Alginates, Gellane
Chaînes latérales	nombreux effets	Solubilité	Xanthane, Gellane
Liaisons (1→3) et/ou (1→4)	Rigidité	Insolubilité	Curdlane, Cellulose
Liaisons (1→2) et/ou (1→6)	Flexibilité	Solubilité, stabilité	Dextranes

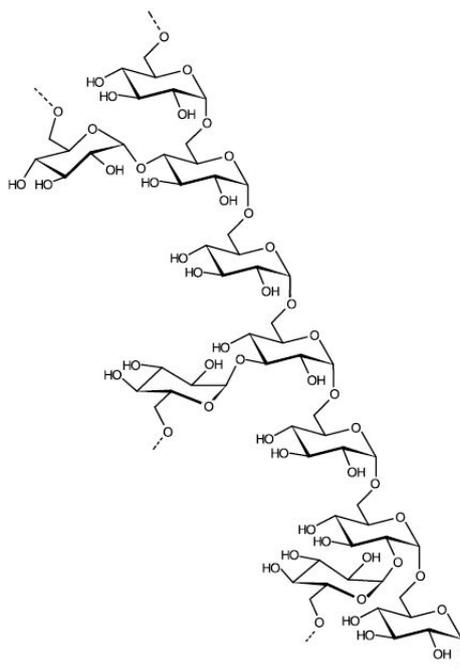
### 1.2.1.1. Polysaccharides bactériens et fongiques

Les microorganismes et les macromycètes constituent une source importante de polysaccharides dans le milieu naturel.

Les bactéries produisent plusieurs types de polysaccharides classés selon leur localisation cellulaire. Certains ont un rôle de réserve et sont localisés dans le cytoplasme. D'autres sont des macromolécules constitutives de la paroi. Enfin, certaines espèces bactériennes excrètent dans leur environnement extracellulaire des polysaccharides associés ou non avec la membrane plasmique. Les principales familles identifiées sont les lipopolysaccharides notés LPS, les polysaccharides capsulaires notés CPS et enfin les exopolysaccharides ou EPS. Les EPS ne sont pas liés aux enveloppes bactériennes de façon covalente et présentent une grande variété de structures (souvent espèce dépendante) ayant des caractéristiques physiques et

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

chimiques uniques. Ces macromolécules de très haute masse molaire sont généralement hydrosolubles et leur excrétion dépend des conditions de culture telles que le rapport C/N ou l'environnement physico-chimique. Le gros avantage en termes d'applications industrielle de ces polysaccharides est la possibilité de les produire en bioréacteur et donc de s'affranchir des contraintes climatiques, écologiques et politiques. Cependant, ce type de procédé est plus onéreux par rapport à l'extraction à partir de matières premières végétales ou macroalgales. Ces exopolysaccharides peuvent être des homo- ou des hétéropolysaccharides (Singh *et al.*, 2015). La grande famille des glucanes bactériens comprend une multitude de polysaccharides différents. Les dextrans constituent un groupe de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucanes variablement ramifiés par des chaînes latérales composées elles aussi de courtes chaînes de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucanes liés à la chaîne principale par des liaisons  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) ou  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Heinze *et al.*, 2006 ; **Figure 7**). La structure d'un dextrane est dépendante de l'espèce de bactérie lactique (Gram +) qui le synthétise et des conditions de culture mais la liaison  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) représente toujours plus de 50 % de l'ensemble des liaisons glycosidiques ce qui lui confère beaucoup de flexibilité et une viscosité faible et indépendante du cisaillement, même à forte concentration (Badel *et al.*, 2011).



**Figure 7: Chaîne de dextrane avec trois points de départ de chaînes latérales (d'après Heinze *et al.*, 2006).**

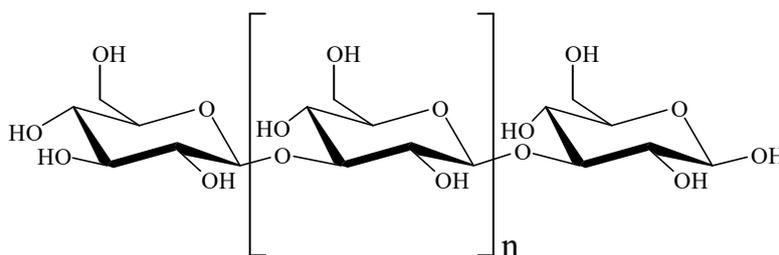
Contrairement à la plupart des EPS de bactéries à Gram-, la biosynthèse des dextrans est extracellulaire et fait appel à des glucansucrases (famille des glycosyltransférases, E.C. 2.4.1.5.) libérées dans le milieu. Les dextrans produits par les bactéries lactiques ont généralement une masse molaire comprise entre  $9 \cdot 10^6$  et  $5 \cdot 10^8$  g/mol et présentent une

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

polydispersité importante (Bovey, 1959 ; Antonini *et al.*, 1965 ; Ioan *et al.*, 2000). L'obtention de dextrans de masses molaires définies implique la mise en œuvre de procédés de précipitation fractionnée, d'ultrafiltration tangentielle ou de chromatographie. Les dextrans sont utilisés comme étalons pour la chromatographie d'exclusion stérique, comme support de chromatographie (Sephadex<sup>®</sup>) ou comme substituts du plasma sanguin (De Belder, 1996, Dellacherie, 1996). Certaines souches de bactéries lactiques telles que *Leuconostoc mesenteroides* ou différentes espèces de *Streptococcus* synthétisent parallèlement aux dextrans d'autres glucanes. Parmi eux on trouve le mutane, polysaccharide insoluble de type  $\alpha$ -(1→3)-D-glucane ou l'alternane qui est un  $\alpha$ -(1→6, 1→3)-D-glucane (Badel *et al.*, 2011).

La cellulose bactérienne est un  $\beta$ -(1→4)-D-glucane linéaire produit comme EPS par certaines bactéries telle que *Gluconoacetobacter xylinus* (Whistler *et al.*, 1993 ; Flemming et Wingender, 2010). Cet EPS est, comme la cellulose végétale, insoluble et s'organise en microfibrilles. Par contre contrairement aux celluloses végétales, il est excrété dans le milieu extracellulaire sans être associé à d'autres polymères ce qui en fait la seule source naturelle de cellulose pure exploitée industriellement pour des applications à très haute valeur ajoutée (industrie pharmaceutique notamment).

Un autre glucane bactériens qui est un des rares et récent succès commercial dans le domaine de l'agroalimentaire est le curdlane. Il s'agit d'un  $\beta$ -(1→3)-D-glucane linéaire (**Figure 8**) produit notamment par des bactéries appartenant aux genres *Agrobacterium*, (McIntosh *et al.*, 2005). Il est insoluble dans l'eau mais soluble dans les solutions alcalines (> 0,2 M). Il présente également un comportement original vis-à-vis de la température lorsqu'il est en suspension aqueuse. Ainsi, un chauffage à 80 °C produit un gel thermo-irréversible alors qu'un chauffage à 55 °C produit un gel thermo-réversible (Zhang *et al.*, 2002).



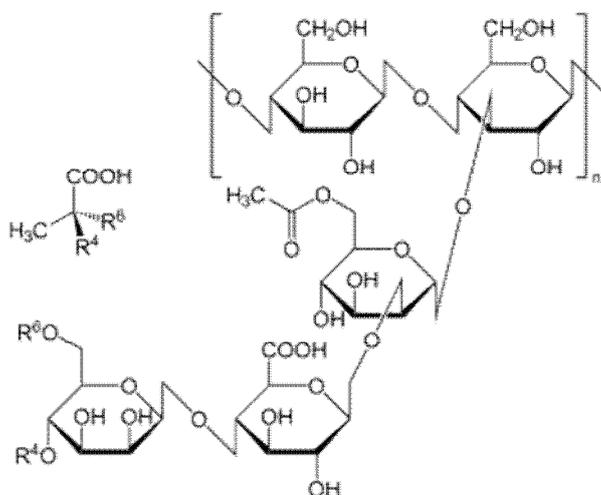
**Figure 8: Structure du curdlane.**

Le curdlane, est utilisé comme gélifiant et stabilisant dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques (Harada, 1996 ; McIntosh *et al.*, 2005). Le Curdlane trouve également des applications dans des secteurs non alimentaires. Sa capacité de rétention d'eau est appliquée dans la formulation du béton, où sa fluidité accrue empêche le ciment et les petites pierres de

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

se séparer (Anonyme, 1996b). Il a également été proposé comme liant organique pour la céramique (Harada, 1992).

La gomme xanthane est un EPS hydrosoluble naturellement synthétisé par *Xanthomonas campestris* (*Pseudomonaceae* – Gram -). Il est exploité à l'échelle industrielle depuis les années 1960 et constitue probablement le plus gros succès en termes de développement industriel au sein de la grande famille des EPS bactériens (Palaniraj et Jayaraman, 2011). Cette gomme est un hétéropolysaccharide ayant une structure primaire constituée d'unités pentasaccharidiques répétées (**Figure 9**). Cette unité est constituée d'une chaîne principale de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucane (cellulose like) ramifiée tous les 2 résidus de glucose par une chaîne latérale trisaccharidiques. Cette dernière contient un résidu D-mannose lié en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3), d'un acide D-glucuronique lié en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) et d'un D-mannose terminal lié en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Près de la moitié des résidus D-mannose terminaux contiennent un résidu d'acide pyruvique lié en O-4 et O-6. La distribution de ces substituants pyruvates est très dépendantes des différentes souches de *X. campestris* et des conditions de culture. Le D-mannose lié à la chaîne principale contient un groupe acétyle en position O-6. La présence d'acide pyruvique et de résidus d'acide glucuronique confèrent un caractère anionique à ce polysaccharide (Garcõaa *et al.*, 2000).



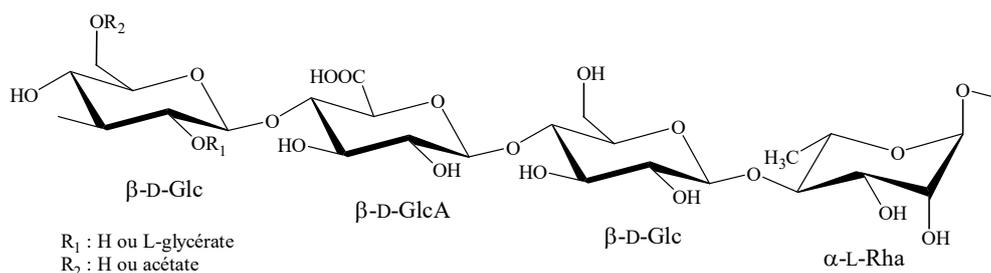
**Figure 9: Structure du xanthane.**

En solution, le xanthane peut adopter différentes conformations (en hélice ou désordonnée) en fonction de la température de dissolution du polysaccharide (Garcia-Ochoa et Casas, 1994). Ce phénomène va influencer la viscosité de la solution obtenue (le xanthane dissous à température modérée sera plus visqueux). Le xanthane est largement utilisé pour sa capacité à générer un gel à faible concentration après chauffage et en synergie avec d'autres polysaccharides tels que les galactomannanes végétaux (Bresolin *et al.*, 1998 ; Dakia *et al.*, 2010). Ces gels se forment après chauffage et refroidissement d'une solution contenant les

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

deux polysaccharides. Le xanthane est un polysaccharide approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) depuis 1969. Ce fluide pseudoplastique est depuis largement utilisé dans les industries agroalimentaires et les préparations cosmétiques pour améliorer la stabilité lors des opérations de congélation-décongélation (Kanlayavattanakul et Nattaya, 2015) et comme épaississant à de faibles concentrations (0,05 % à 0,5 % m/m). Son succès provient de sa stabilité à pH acide ou basique ainsi qu'en présence de sels.

La gomme gellane est constituée par des unités tétrasaccharidiques répétées et comprenant deux résidus D-glucoses liés en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), un L-rhamnose lié en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3), et un acide D-glucuronique lié en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (**Figure 10**). Elle est obtenue à partir de cultures de la bactérie *Sphingomonas paucimobilis* (anciennement nommée *Sphingomonas elodea*). Le gellane natif est partiellement acétylé en C-6 et glycérolé en C-2 sur le glucose lié en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) avec le rhamnose (Lee *et al.*, 2012) Cette substitution, au même titre que la masse moléculaire du gellane peuvent sensiblement varier en fonction des conditions de culture et du milieu utilisé.



**Figure 10: Structure de l'unité de répétition tétrasaccharidique du gellane.**

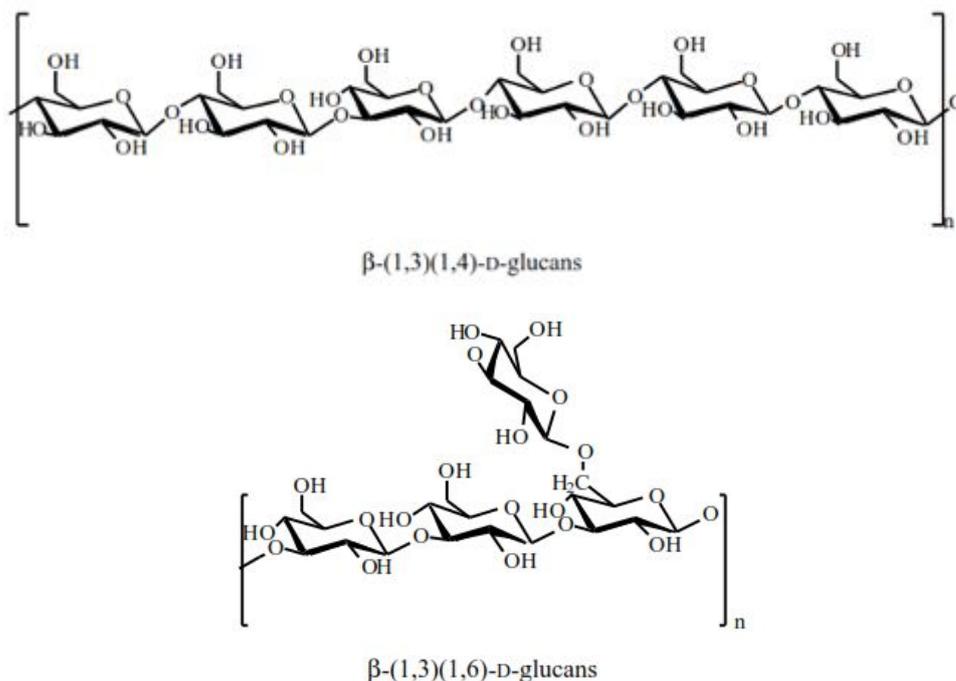
Le gellane forme des solutions très visqueuses, même à de faibles concentrations et est utilisé pour ses propriétés stabilisantes et gélifiantes dans l'industrie agroalimentaire. En présence de cations divalents, le gellane natif produit un gel souple et élastique, alors que le gellane désacétylé forme un gel dur et cassant (Chandrasekaran et Radha, 1995). Le gellane est également utilisé comme excipient dans l'industrie pharmaceutique permettant la libération lente du composé actif (Lee *et al.*, 2012).

Les champignons au sens large sont connus et utilisés de longue date pour la production de polysaccharides, certains d'entre eux étant porteurs d'activités biologiques (Cheung, 2008 ; Wasser, 2013). Les polysaccharides fongiques peuvent être intracellulaires, associés aux enveloppes ou extracellulaires. Ce sont typiquement des chitines et des glucanes qui ont des structures et des masses moléculaires différentes selon l'organisme à partir duquel ils sont isolés ou en fonction des conditions de culture (Montoya *et al.*, 2013). La plupart des

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

polysaccharides synthétisés par des champignons sont des  $\beta$  et/ou  $\alpha$  homoglucones, des mannanes et dans une moindre mesure des galactomannanes. Des hétérosides de type peptidoglycane ou glycoprotéine sont également présentes chez ces organismes (Becerra *et al.*, 2011). Les  $\beta$ -glucanes qui sont des homopolymères du D-glucose sont les glucides les plus abondants dans les parois cellulaires de plusieurs microorganismes tels que les champignons et les levures. A noter qu'on les trouve également en abondance chez les algues, les bactéries, les lichens et les plantes. Ces glucides présentent différents types de liaisons glycosidiques, telles que des liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) et  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3). On les trouve parfois associés de façon covalente à des protéines comme c'est le cas pour certains glucomannanes et galactomannanes (Ooi et Liu, 2000).

Les  $\beta$ -glucanes font partie des polysaccharides fongiques les plus étudiés. Ce sont des  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanes linéaires ramifiés par des résidus glucoses liés en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) (Laroche et Michaud, 2007 ; **Figure 11**). Parmi les plus connus on peut citer le scléroglycane, le schizophyllane, le pustulane ou le lentinane qui diffèrent par leur masse moléculaire, leur conformation en simple ou triple hélices et leur degré de ramification (Laroche et Michaud, 2007). Ces glucanes, une fois en solution, sont généralement très visqueux quelle que soit la température ou la force ionique du milieu. Ils présentent un fort caractère pseudoplastique (Fariña *et al.*, 2001). D'autres types de  $\beta$ -glucanes fongiques sont décrits de façon plus minoritaire dans la littérature, tels que les  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-D-glucanes qualifiés de lichenane et d'isolichenane.



**Figure 11: Structure des  $\beta$ -glucanes.**

Les  $\beta$ -glucanes présentent une large gamme d'activités biologiques et sont utilisés en médecine traditionnelle (Laroche et Michaud, 2007). Différents facteurs comme la structure primaire, la solubilité, le degré de ramification, la masse moléculaire, la charge du polymère et la conformation dans les milieux aqueux influents sur les activités biologiques des  $\beta$ -glucanes et notamment sur leurs activités immunomodulatrices. Certains  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanes ont ainsi montré une aptitude à stimuler l'immunité innée et présentent des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* (Kogan et Kocher 2007 ; Mantovani *et al.*, 2008, Brown et Williams, 2009). L'activité immunomodulatrice des  $\beta$ -glucanes est associée à l'induction de la production du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), d'interféron  $\gamma$ , d'interleukine 8 (IL-8) et d'oxyde nitrique. Elle se traduit également par l'activation des macrophages et des lymphocytes T cytotoxiques (El Enshasy et Hatti-Kaul, 2013). Certains  $\beta$ -glucanes porteurs de liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4) et obtenus à partir de *Saccharomyces cerevisiae* présentent des activités antiparasitaires, antibactériennes, antivirales, antifongiques, antimutagènes et antitumorales (Zong *et al.*, 2012). Des glucanes de même type sont isolés de différentes souches fongiques telles que *Auricularia polytricha*, *Grifola frondosa*, *Candida albicans*, *Poria cocos*, *Agaricus blazei*, *Lentinus edodes*, *Schizophyllum* commune et *Coriolus versicolor* présentent des propriétés antitumorales, immunomodulatrices et antimutagènes (Lin *et al.*, 2010; Carneiro *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013).

Au sein de la grande famille des  $\alpha$ -homoglucanes fongiques, le pullulane est probablement le polysaccharide qui a été le plus étudié. Principalement décrit chez la souche *Aureobasidium pullulans*, le pullulane est un homopolysaccharide de glucose dont l'unité de répétition est de type  $(\rightarrow 6-\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow)_n$ . (Singh *et al.*, 2008 ; Bauer, 1938). Ce polysaccharide a fait l'objet de nombreuses applications à haute valeur ajoutée dans l'industrie pharmaceutique (Leathers, 2003 ; Scott *et al.*, 2005 ; Gaddy *et al.*, 2006 ; Leung *et al.*, 2006 ; Wolf, 2005). Le pullulane se dissout rapidement dans l'eau et donne des solutions peu visqueuses indépendamment de la température, du pH et de la présence de sels (Tsujisaka *et al.*, 1993). A l'état solide, il est non-hygroscopique. Il a également été décrit comme prébiotique (Mitsunashi *et al.* 1990 ; Yoneyama *et al.* 1990 ; Sugawa-Katayama *et al.* 1994). Il a été utilisé pour la fabrication de films plastiques imperméables au passage de l'oxygène et offrant de bonnes propriétés mécaniques (Leung *et al.*, 2006).

Les mannanes correspondent à la partie glucidique de glycoprotéines issues de parois fongiques. Ils sont composés majoritairement de résidus mannoses liés en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) et  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2). La structure des mannanes qui peuvent contenir quelques autres types

de monosaccharides est espèce dépendante mais dépend également des conditions de culture de la souche productrice (Kobayashi *et al.*, 1997, Okawa *et al.*, 2006). Les mannanes ont montré des activités immunostimulantes mais également cytotoxiques (Tada *et al.*, 2002 ; Ohno, 2003 ; Miura *et al.*, 2003).

### 1.2.1.2. Polysaccharides d'algues

Une variété importante de polysaccharides tels que les ulvanes, les alginates, et la grande famille des galactanes sulfatés incluant l'agar, l'agarose et les carraghénane peut être obtenue à partir de macroalgues marines (Laurienzo, 2010).

Comme pour les polysaccharides issus d'autres organismes, différentes classifications de polysaccharides issus de macroalgues sont rencontrées dans la littérature : polysaccharides de structure et matriciels ; polysaccharides anioniques et neutres et enfin polysaccharides sulfatés et non sulfatés. La sulfatation de nombreux polysaccharides de macroalgues étant une spécificité propre à ce groupe d'organismes (à l'exception des glycosaminoglycanes), c'est ce dernier mode qui sera utilisé dans ce manuscrit (Ladislava *et al.*, 2015). Dans les paragraphes qui vont suivre seuls quelques exemples des principaux groupes de polysaccharides seront donnés de façon non exhaustive.

#### 1.2.1.2.1. Polysaccharides non-sulfatés

Si on fait abstraction des polysaccharides de structure tels que la cellulose ou des polysaccharides de réserve tels que l'amidon ou les laminaranes ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3 ; 1 $\rightarrow$ 6)-D-glucanes) les macroalgues marines possèdent assez peu d'hydrocolloïdes non sulfatés à l'exception des alginates. Les alginates, sont des hétéropolyuronides (**Figure 12**) constitués d'acides  $\beta$ -D-mannuronique (M) et  $\alpha$ -L-guluronique (G) liés respectivement en  $\beta$ - et en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Ils sont produits par des macroalgues brunes. Leur structure, sans réelle unité de répétition, varie en fonction des espèces d'algues, de l'endroit où elles se développent et des organes utilisés pour l'extraction. Elle est cependant toujours organisée sous la forme de blocs homo- (blocs MM et blocs GG) et hétéropolymériques (blocs MG) (Rioux *et al.*, 2007, Miller 1996 ; Ladislava *et al.*, 2015). Les alginates ne sont pas des polysaccharides exclusivement extraits d'algues car ils sont également synthétisés par certaines espèces bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* et *Azotobacter vinelandii*) comme exopolysaccharides (Rehm et Winkler, 1996 ; Rehm et Valla, 1997). Ces alginates bactériens possèdent une spécificité qui est la présence d'acétates en C-2 et/ou en C-3 des résidus d'acides mannuroniques (Ertesvåg et Erlén, 1998).

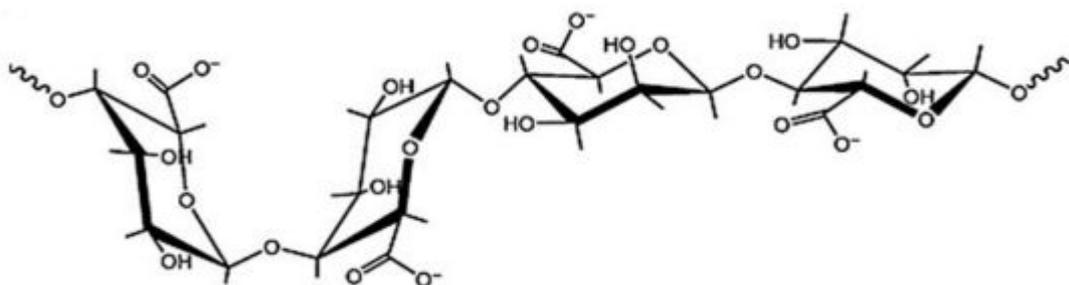


Figure 12: Structure des alginate (Coviello *et al.*, 2007).

Les propriétés rhéologiques et biologiques des alginate sont fortement dépendantes de la répartition, de la teneur et de la longueur de certains blocs. Ainsi si on considère les propriétés rhéologiques, des teneurs importantes en blocs G rigidifient les chaînes d'alginate (Smidsrød *et al.*, 1973 ; Stokke *et al.*, 1990) et conduisent à l'obtention de solutions plus visqueuses. En présence de cations et notamment des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , l'alginate forme des gels dont la résistance est également fonction de la teneur et de la longueur en blocs G. Des gels comportant une forte teneur en acides guluroniques sont très résistants, présentent une plus grande porosité, un faible retrait durant la gélification et un faible gonflement au séchage. A l'inverse, des fortes teneurs en acides mannuroniques permettent l'obtention de gels plus souples. La conformation des blocs G permet la formation de sites de chélation formés par 4 atomes d'oxygène qui offrent une géométrie et un espace adapté au positionnement de l'ion calcium (Figure 13). Ce modèle de gélification est appelé boîte à œufs (« egg box model »).

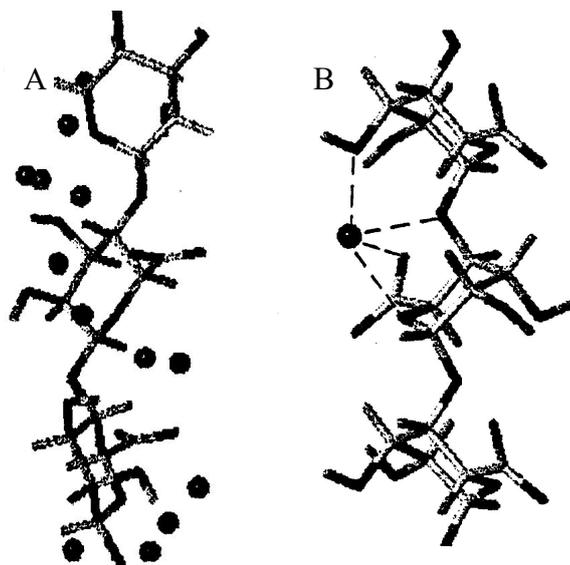


Figure 13: Localisation d'un site de chélation d'un ion calcium (●) sur un bloc M (A) et d'un bloc G (B) (d'après Braccini *et al.*, 1999).

Les propriétés biologiques des alginates sont également fortement dépendantes de leur teneur en différents types de blocs. A titre d'exemple il semble que les propriétés immunostimulantes de ces polyuronides soient dépendantes de la teneur en blocs M (Otterlei *et al.*, 1991). Les alginates font l'objet de nombreuses applications industrielles principalement comme texturant (agents gélifiant et épaississant). Dans l'industrie textile, la papeterie ou la céramique, ils sont utilisés pour les traitements de surface. Le caractère gélifiant de l'alginate est aussi utilisé pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules (Kühtreiber *et al.*, 1999 ; Ertesvåg et Valla, 1998 ; Soon-Shiong *et al.*, 1994).

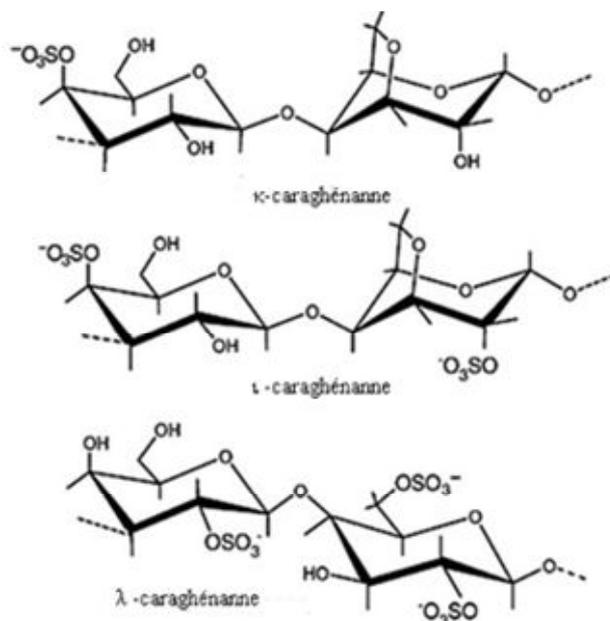
### 1.2.1.2.2. Polysaccharides sulfatés

Chez les différents types de macroalgues marines (rouges, vertes et brunes), les polysaccharides sulfatés sont des polysaccharides qualifiés le plus souvent de polysaccharides matriciels. Ce sont des hydrocolloïdes de structures très complexes parmi lesquels on trouve notamment des galactanes sulfatés, des fucoidanes et des ulvanes.

### 1.2.1.2.3. Carraghénanes

Les carraghénanes sont des D-galactanes sulfatés de masses moléculaires élevés issus de macroalgues rouges marines telles que *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae), *Eucheuma spinosum* (Solieriaceae) ou des espèces appartenant aux genres *Chondrus* et *Gigartina* (Lim *et al.*, 2014). Ils sont composés d'unités disaccharidiques répétitives avec une alternance de  $\beta$ -D-galactopyranose (unité G) et d' $\alpha$ -D-galactopyranose (unité D) ou 3,6-anhydro- $\alpha$ -galactopyranose (unité DA) liées respectivement en (1 $\rightarrow$ 3) et (1 $\rightarrow$ 4) (Jiao *et al.*, 2011 ; **Figure 14**). Les carraghénanes sont variablement sulfatés et présentent différents taux d'unités DA ce qui permet de les classer en différentes familles. On distinguera ainsi les carraghénanes de type  $\lambda$  (Lambda),  $\kappa$  (Kappa),  $\iota$  (Iota),  $\nu$  (Nu),  $\mu$  (Mu),  $\theta$  (Thêta) et  $\xi$  (Ksi) (Prajapati *et al.*, 2014). Toutes ces familles correspondent à une unité de répétition majoritaire présente dans la structure du polysaccharide. Ainsi un carraghénane  $\lambda$  est composé principalement d'unités de répétition  $\lambda$  mais peut comporter d'autres disaccharides ainsi que quelques substituants méthyle ou pyruvate. Les unités  $\nu$  et  $\mu$  sont les précurseurs des unités  $\kappa$ - et  $\iota$ -. La réaction est catalysée par des sulfatases ou galactose-6-sulfurylases (EC 2.5.1.5.) qui convertissent des unités galactose sulfatées en C-6 en résidus 3,6-anhydrogalactose. Cette réaction peut également être effectuée par traitement alcalin. La présence de résidus 3,6-anhydrogalactoses donne au polysaccharide des propriétés gélifiantes. Ainsi, les  $\kappa$ - et  $\iota$ -carraghénanes forment des gels en présence de cations. Ils sont utilisés industriellement comme gélifiants alimentaires. La présence d'unités  $\mu$  et  $\nu$  dans les  $\kappa$ - et  $\iota$ - carraghénanes

diminue leur pouvoir gélifiant (Bellion *et al.* 1983 ; Van de Velde *et al.* 2002) car le taux de sulfatation influence défavorablement la stabilité des gels.



**Figure 14: Structure des carraghénanes (Coviello *et al.*, 2007).**

La force ionique et la nature des cations présents (potassium ou calcium) dans la solution influence fortement la gélification (Morris *et al.*, 1980). Du fait de leurs propriétés gélifiantes, les carraghénanes sont un bon substitut à la gélatine et aux pectines. Ils sont également utilisés comme additifs alimentaires (E407) pour leurs propriétés stabilisantes et épaississantes (yaourts, glace, sauce, etc.) ou bien dans les cosmétiques (dentifrice, crème hydratante, etc.). Les carraghénanes forment des gels plus ou moins résistants en fonction de leur structure. Ainsi, les  $\kappa$ -carraghénanes forment des gels rigides solides, les  $\iota$ -carraghénanes forment des gels élastiques souples, et les carraghénanes  $\lambda$  sont non gélifiants (Sartal *et al.*, 2011). En outre, les carraghénanes, sont au centre de nombreuses recherches pour leurs activités biologiques. Les carraghénanes, sont capables de réduire l'absorption du cholestérol (Jimenez-Escrig et Sánchez-Muniz 2001) de présenter des propriétés anticoagulantes (Sen *et al.*, 1994; Farias *et al.*, 2000), antioxydantes, antitumorales (Hoffman *et al.*, 1995), anti-inflammatoires, et antivirales (Misurcová *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2010). Selon Jouanneau (2010) et Silva *et al.* (2012), les activités anticoagulantes des carraghénanes sont attribuées à leur similarité structurale avec les glycosaminoglycanes (GAGs). Cette famille de polysaccharides, dont les membres les plus connus sont l'héparine, les chondroïtines sulfate, et le dermatane, L'héparine est à l'heure actuelle l'anticoagulant le plus utilisé dans le traitement de la thrombose. Certains carraghénanes pourraient ainsi être utilisés comme substitut de l'héparine sans en avoir les effets secondaires (Sen *et al.*, 1994 ; Carlucci *et al.*, 1997 ; Farias *et al.*, 2000

; Yamada *et al.*, 2000). Les propriétés antivirales des carraghénanes s'expliqueraient par un blocage de l'adsorption des virus (HIV, Herpès simplex, Hépatite A) à la surface des cellules (Carlucci *et al.*, 1997; Carlucci *et al.*, 2002; Carlucci *et al.*, 2004). De même, leur structure (squelette carboné et groupement sulfaté) leur permettrait de se lier à certains facteurs de croissance (en particulier ceux impliqués dans la prolifération des tumeurs) leurs confèrent ainsi des propriétés anticancéreuses (Parish *et al.*, 1987; Hoffman, 1993; Hoffman *et al.*, 1995).

### 1.2.1.2.4. Fucoïdanes

Les Fucoïdanes sont les composants principaux des parois cellulaires de plusieurs ordres d'algues brunes, en particulier les Fucales et les Laminariales. À noter que leur présence est la plupart du temps concomitante à celle d'alginate, les deux polysaccharides étant présents chez les algues brunes. Les fucoïdanes également qualifiés parfois de fucanes ou de fucanes sulfatés sont des polysaccharides composés majoritairement de résidus L-fucoses liés en  $\alpha$ -(1→3) ou en  $\alpha$ -(1→4) variablement substitués par 1 ou 2 non sucres (sulfate ou acétate) sur le C-2, le C-3 ou le C-4. Des unités mono-, di- et trisaccharidiques composés de D-xylose, d'acide D-glucuronique, le D-galactose et le D-mannose viennent ramifier cette structure principale (Bertheau et Mulloy, 2003). Les fucanes ont montré des activités biologiques semblables à celles des glycosaminoglycane auxquels ils sont souvent comparés (Bertheau et Mulloy, 2003).

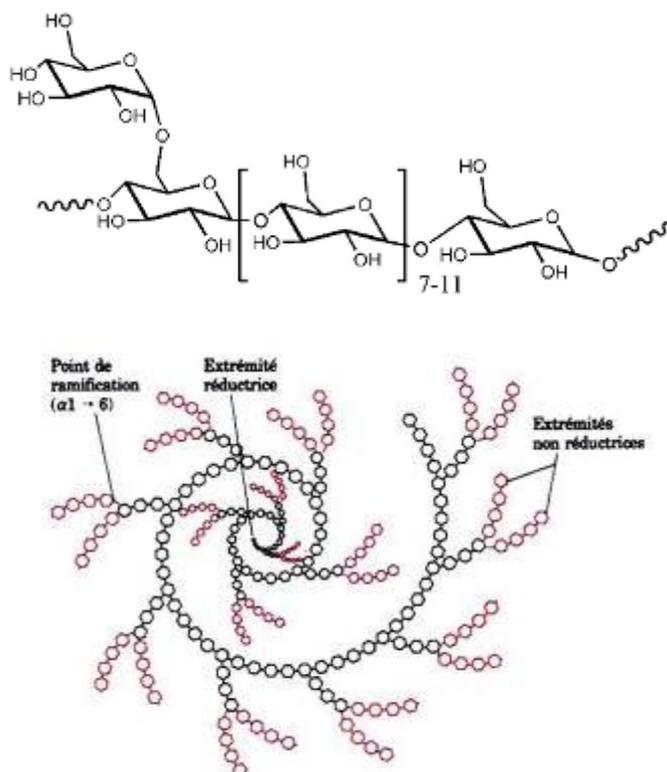
### 1.2.1.2.5. Ulvanes

Les ulvanes sont des hétéropolysaccharides hydrosolubles hautement sulfatés extraits de la paroi cellulaire de certaines algues vertes appartenant au genre *Ulva*. Ils sont constitués de rhamnose, de xylose, d'acides iduroniques et glucuroniques et de groupes sulfates. Ces polysaccharides sulfatés sont de structure complexe et hétérogène (Jiao *et al.*, 2011). Les principaux constituants de l'ulvane sont des unités disaccharidiques de type 4- $\beta$ -D-glucuronosyl-(1→4)- $\alpha$ -L-rhamnose-3-sulfate-(1→, appelé acide aldobiouronique (Lahaye *et al.*, 1997 ; Jaulneau *et al.*, 2010) variablement ramifiées par des résidus de xylose, mannose, galactose et glucose (Shanmugam *et al.*, 2002 ; Mao *et al.*, 2008). Une prolifération des *Ulva* sur certains littoraux du fait de pollutions (nitrates et phosphates) a conduit à de nombreux travaux en vue de valoriser et traiter cette biomasse. L'ulvane et les oligoulvanes ont ainsi été testés avec succès pour des applications telles que l'élicitation des réactions de défense des plantes, l'industrie pharmaceutique, la nutrition humaine et dans la dépollution des métaux lourds.

### 1.2.2. Polysaccharides d'origine animale

#### 1.2.2.1. Le glycogène

Le glycogène est l'analogie de l'amidon dans les plantes, appelé parfois l'amidon animal, ayant une structure similaire à l'amylopectine mais plus ramifié et compact que l'amidon. Le glycogène est constitué de nombreuses unités de D-glucose lié en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) et est branché en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) tous les 8 ou 12 résidus et une ramification tous les 20 à 30 résidus chez l'amylopectine (Weinman et Mehul, 2004) (**Figure 15**).



**Figure 15: Structure du glycogène (Pal *et al.*, 2015)**

Le glycogène du foie contient ainsi 30000 unités de glucose. Son poids moléculaire varie de 1 à  $5 \times 10^6$  g/mol selon son origine. Le glycogène est un polymère hydrosoluble homogène avec des branches réparties relativement uniformément (Roach 2002). Le glycogène sert pour le stockage de l'énergie dans des cellules animales et fongiques, et permet de libérer rapidement du glucose (principalement dans le foie et dans les cellules musculaires) au même titre que l'amidon chez les végétaux. Ainsi il se retrouve dans d'autres organismes tels que les archées, les bactéries et certains eucaryotes (Busi *et al.*, 2012).

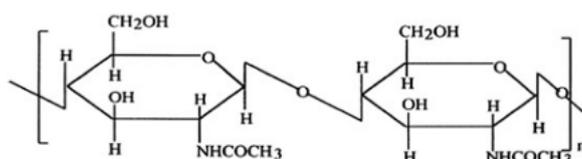
#### 1.2.2.2. La chitine

La chitine est un polysaccharide azoté blanc, dur, inélastique. C'est le deuxième biopolymère le plus abondant après la cellulose. On le trouve dans l'exosquelette des arthropodes (Suh et

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Matthew, 2000), dans les parois cellulaires de champignons et de levures mais aussi chez d'autres plantes inférieures ainsi que dans les structures internes des invertébrés. Il s'agit d'un polymère linéaire de résidus *N*-acétyl-glucosamines et de résidus glucosamines liés en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). La chitine existe sous en trois isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . L' $\alpha$ -chitine est la plus abondante (Khoushab et Yamabhai, 2010). Sa masse moléculaire est comprise entre  $1,03 \cdot 10^6$  et  $2,5 \cdot 10^6$  g/mol (Ravi, 2000 ; **Figure 16**). L' $\alpha$ -chitine est présente dans les parois des champignons et des levures, les cuticules d'insectes, les coquilles d'œufs des nématodes et des rotifères, les ridules de mollusques et les cuticules d'arthropodes. Cette forme de chitine est également présente dans le krill, le homard, les crabes, et les coquilles de crevettes, ainsi que dans d'autres organismes marins tels que les escargots et les algues.

La  $\beta$ -chitine se trouve dans le stylo et la cuticule des calmars et de la diatomée dans des chaînes parallèles. La liaison hydrogène entre liaisons se produit entre les feuilles dans des directions différentes. Il existe également une liaison hydrogène intermoléculaire entre les groupes CHOH, qui est censé être la raison du manque de gonflement de l' $\alpha$ -chitine dans l'eau. La  $\beta$ -chitine possède une cellule unitaire monoclinique avec des chaînes de polysaccharides attachées de manière parallèle (Gardner et Blackwell, 1975). Dans la  $\beta$ -chitine, la liaison hydrogène se produit uniquement dans les feuilles, pas entre les feuilles comme dans l' $\alpha$ -chitine. Ceci est censé être responsable du gonflement de la  $\beta$ -chitine dans l'eau, car l'eau peut être comprise entre les feuilles. L' $\gamma$ -Chitine est une combinaison de la structure  $\alpha$  et  $\beta$  plutôt qu'un troisième polymorphe (Robert 1992). *Thalassiosira flviaistilis*. Dans l' $\alpha$ -chitine, les feuilles sont formées par une liaison hydrogène intermoléculaire.



**Figure 16: Structure de la chitine**

La désacétylation partielle de la chitine en condition basique ou par hydrolyse enzymatique conduit par une chitine désacétylase donne le chitosane qui n'existe pas à l'état naturel est soluble dans les solutions acides où il acquiert un caractère cationique unique (Kanlayavattanakul et Nattaya, 2015). Le chitosane fait l'objet de nombreuses applications dans différents domaines industriels du fait de ses propriétés uniques. Il est biocompatible, antimicrobien et biodégradable. Il est utilisé dans le domaine médical comme biomatériau, adhésif biocompatible ou comme agent de cicatrisation. Il est également utilisé et valorisé dans l'encapsulation de médicaments (Venter *et al.*, 2006). Le chitosane a également des

applications en tant qu'éliciteur des réactions de défenses et stimulant de la croissance des plantes (Kauss *et al.*, 1989 ; Van der *et al.*, 1998) ; comme agent floculant, épaississant et stabilisant (Varma *et al.*, 2004 ; Kosyakov *et al.*, 2003 ; Kumar, 2000).

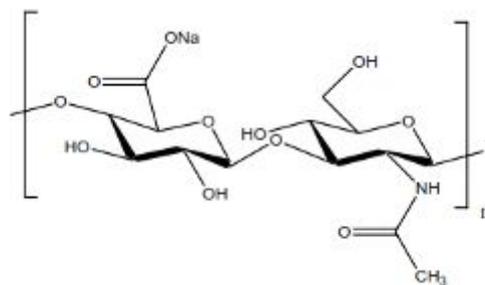
### 1.2.2.3. Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes sulfatés ou non (GAGs) représentent un groupe de polysaccharides bioactifs d'origine d'animal (Liu *et al.*, 2015). Ils couvrent pratiquement la surface de toutes les cellules des eucaryotes (Efthimiadou *et al.*, 2015). Ils constituent un groupe homogène de glycanes linéaires anioniques. Sauf dans le kératane sulfate, les GAGs sont composés d'unités dissaccharidiques répétées, formées par un ose aminé (*N*-acétyl-glucosamine ou *N*-acétyl-galactosamine) et un acide uronique (D-glycuronate ou L-iduronate).

L'acide hyaluronique ou hyaluronan (HA) avec d'autres glycosaminoglycanes (GAGs) qui sont le sulfate de dermatane, le sulfate de chondroïtine et le sulfate de kératine forment le fluide prédominant de la peau responsable de l'élasticité de la peau (Koshiishi *et al.*, 1999). Les GAGs montrent plusieurs bioactivités associées à des processus inflammatoires ou à la réparation tissulaire (Gandhi et Mancera 2008, Mulloy et Linhardt 2001). Ils servent à lubrifier et consolider nos articulations, maintenir nos organismes en bon état, gérer notre agrégation plaquettaire et même combler nos rides (cf. *Botox*, *biotox*).

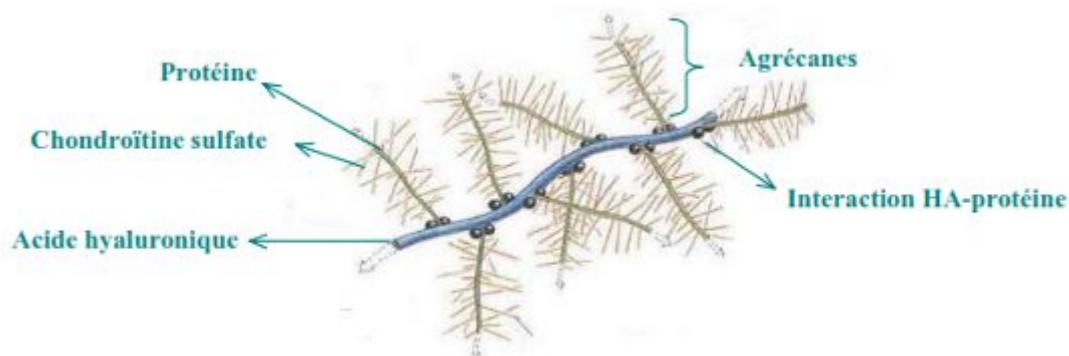
#### 1.2.2.3.1. L'acide hyaluronique (HA)

L'acide hyaluronique est un polysaccharide naturel appartenant à la famille des glycosaminoglycanes, trouvé dans la matrice intercellulaire de la plupart des tissus conjugués des vertébrés y compris la peau. L'acide hyaluronique tire son nom du grec *hyalos* (vitreux), car il a d'abord été isolé pour la première fois par Meyer et Palmer en 1934 à partir de l'humeur vitrée des yeux des bovins (Rubinstein *et al.* 1997), puis dans le liquide synovial dont il assure la fluidité, et la peau dont il maintient l'hydratation. Le HA est composé d'une chaîne linéaire anionique non ramifiée dont le motif dissaccharidique de répétition est l'acide D-glucuronique liée en  $\beta$ -(1→3) à l'unité *N*-acétyl-D-glucosamine (Chong *et al.*, 2005; Kogan *et al.*, 2007; Necas *et al.*, 2008) (**Figure 17**). Ces motifs sont reliés par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -(1→4). La longueur du motif de répétition du HA en solution est évaluée à 10 Å. C'est le seul GAG à ne pas exister sous forme sulfatée, ni liée à une protéine (Weinman et Mehul, 2004). Il est produit industriellement à partir de crêtes de coq, mais aussi par fermentation bactérienne (Moscovici *et al.*, 2015).



**Figure 17: Unité de répétition disaccharidique du hyaluronane.**

L'acide hyaluronique se trouve principalement dans la matrice extracellulaire (ECM) et dans la matrice péricellulaire. Evanko et Wight (2002) ont montré que le HA est présent à l'intérieur des cellules. Dans le corps humain, les zones qui sont les plus riches en HA sont la peau, le liquide synovial, le cordon ombilical et l'humeur vitreuse de l'œil. Comme l'hyaluronate de sodium (hyaluronane), il joue un rôle physiologique important dans les organismes vivants, y compris le corps humain. Dans la peau, l'acide hyaluronique immobilise les molécules d'eau dans le tissu et permet de changer le volume dermique ; ses propriétés hydratantes en font un favori de l'industrie cosmétique et de la chirurgie esthétique ; mais il sert aussi en chirurgie ophtalmologique. Le HA peut aussi influencer la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire. Le vieillissement et la régénération tissulaire (cicatrisation) sont souvent causés par un changement de la concentration en HA dans certaines zones, ce qui accentue son rôle important dans la peau (Guo *et al.*, 1994). Dans le cartilage, le HA est un élément structural important de la matrice extracellulaire, il forme un centre d'agrégation avec les protéoglycanes et les chondroïtines sulfatés qui retiennent les assemblages macromoléculaires grâce aux interactions spécifiques HA-protéines (**Figure 18**) (Mukerjee *et al.*, 1971 ; Eli *et al.*, 1999). La forte concentration de HA de haute masse molaire dans le liquide synovial (LS), allant jusqu'à  $10 \cdot 10^6$  g/mol, permet de lubrifier l'articulation et d'absorber les chocs. Lors d'affections osseuses articulaires ou péri-articulaires (autour de l'articulation), d'origine inflammatoire ou mécanique, le HA de forte masse molaire se trouve dégradé par des agents réactifs oxygénés qui réduisent sa viscosité et donc ses propriétés lubrifiantes et protectrices, provoquant l'altération du cartilage accompagnée de douleurs lors des mouvements, puis l'usure des extrémités osseuses (Fenyvesi *et al.*, 1996).



**Figure 18: Représentation schématique d'une partie de la matrice extracellulaire avec un agrandissement du complexe protéoglycane-HA (Funasaki *et al.*, 2000).**

Pendant longtemps, on pensait que le HA servait essentiellement de matière de comblement de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Après plusieurs études sur l'interaction HA-protéines et HA-récepteurs il a été montré que le HA avait d'autres activités fonctionnelles (Wilson *et al.*, 1998). Le HA est reconnu pour son rôle dans l'embryogenèse et dans la migration des cellules musculaires au cours du développement de l'embryon. Le HA exerce aussi de multiples fonctions dans l'induction de la prolifération, de la migration, de la formation des tubules rénaux ou encore dans le processus tumoral et métastatique (Gonzalez *et al.*, 1997).

### 1.2.2.3.2. L'héparine

L'héparine découverte dès 1916 par Mac Lean, est un glycosaminoglycane hautement sulfaté, et elle est la molécule biologique qui possède la plus haute densité connue de charges négatives. L'héparine un mélange hétérogène de polysaccharides sulfatés de charge négative composés de résidus d'acide glucuronique et d'acide uronique (Hirsh *et al.*, 2004). Il s'agit en fait de l'enchaînement d'hexasaccharides contenant de l'acide iduronique (IdoA) 2-sulfate, glucosamine (GlcN) 2,6-disulfate et de l'acide glucuronique (GlcA) non sulfaté.

L'héparine est naturellement produite par les basophiles et les mastocytes (cellules de l'immunité non spécifique) lors de la réponse immunitaire (Marshall *et al.*, 2004); en médecine, il est principalement utilisé comme un anticoagulant très puissant, pour traiter et prévenir la formation des caillots de sang dans les veines et les artères (la thrombose) (Pereira *et al.*, 2002, Streusand *et al.*, 1995).

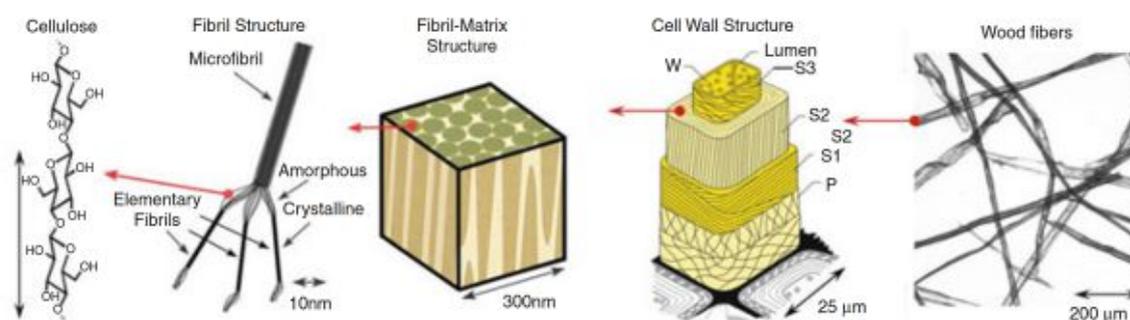
### 1.2.3. Polysaccharides issus de plantes terrestres

Les polysaccharides se trouvent principalement dans des plantes et les algues qui produisent plus de 90 % des polysaccharides totaux existant sur la terre. Sur la base de leur rôle

biologique, ils peuvent être classés en polysaccharides structuraux, en polysaccharides de réserves d'énergie et en exsudats et mucilages (Di Donato *et al.*, 2015).

### 1.2.3.1. Polysaccharides structuraux

Les parois cellulaires des plantes vertes (**Figure 19**) et d'autres eucaryotes photosynthétiques sont constituées de polysaccharides essentiels à la croissance, au développement et à la défense des cellules. La plupart des parois cellulaires présentent une micro-architecturale composée de polysaccharides fibrillaires tels que la cellulose et les hémicelluloses mais également d'un hydrogel de pectine et de lignines (polymère non glucidique). Ces structures contiennent également des taux variables de protéines.



**Figure 19: Différents niveaux structuraux des molécules de cellulose dans la paroi cellulaire de la plante (Agarwal, 2006 et Moon *et al.*, 2011).**

Comme illustré sur la **Figure 19**, l'architecture de la paroi cellulaire se caractérise par des couches différentes qualifiées de paroi primaire (P), de paroi secondaire composée d'une couche extérieure (S1), intermédiaire (S2) et intérieure (S3) et de la lamelle moyenne qui est la couche la plus externe (Agarwal 2006). Chacune des couches celluloses (P, S1, S2 et S3) est fondamentalement une maille de fibrilles avec une densité, une texture et une épaisseur différentes. La paroi cellulaire primaire, qui contient en plus de la cellulose, de plus grandes quantités d'hémicelluloses, de pectines et de protéines. Elle est inférieure à 0,1-0,2 µm d'épaisseur et ne contribue qu'à hauteur de 1 à 4 % de la masse totale de la paroi. Les différentes lamelles de la paroi P sont caractérisées par l'orientation de leurs microfibrilles de cellulose. Dans la lamelle extérieure, les microfibrilles forment un réseau irrégulier, tandis que dans la lamelle interne, ils ont une orientation presque transversale. La lamelle moyenne est une matrice qui sépare les cellules entre elles. Elle est principalement constituée de pectines.

Les parois cellulaires primaires peuvent être classées en deux types principaux (Carpita et Gibeau 1993). Les parois de type I caractérisées par la présence de glucuronoxylanes

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

(hémicellulose réticulée) et de type II composées de xylandes réticulé. Dans les deux types, la cellulose (~30 % m/m) est le polymère qui assure la rigidité de l'ensemble. Les teneurs en pectine représentent ~ 30 % (m/m) dans les parois de type I et seulement 2-10 % (m/m) dans les parois de type II (Jarvis 1984 ; Carpita et Gibeaut 1993). Les parois de type I contiennent des protéines structurales à hauteur d'environ ~ 10 % (m/m) contre 2 à 10 % (m/m) pour celles de type II (Chen et Varner, 1985 ; Hong *et al.*, 1989; Carpita et McCann 2000 ; Fincher, 2009a). Le **Tableau 5** résume les différences entre les parois primaires de type I et de type II.

**Tableau 5: Comparaison des teneurs en polymère (% p / p) entre les parois cellulaires primaires de type I et de type II (Selon Carpita et Gibeaut 1993, Carpita 1996, Carpita et McCann 2000).**

Polymère	Paroi Type I	Paroi Type II
Cellulose	30–40	30–40
Pectine	~30	2-10
Protéines	10	2-10
Xyloglucanne	20	Trace
Xylanne	5	20-30
Mannane	3	5

La paroi secondaire est constituée de trois couches avec une épaisseur totale de 3 à 5  $\mu\text{m}$ . Elle est composée d'un réseau de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Les différentes couches S1, S2 et S3 se distinguent les unes des autres par l'orientation des microfibrilles de cellulose.

### 1.2.3.1.1. La Cellulose

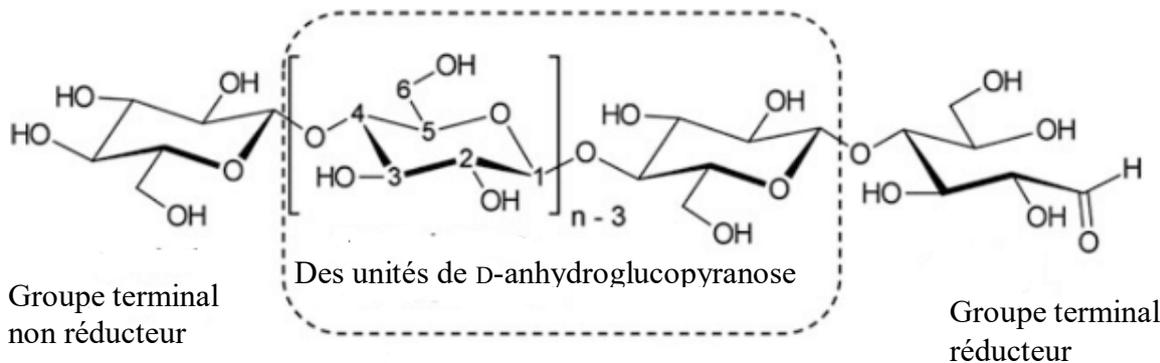
La cellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Il est principalement végétal même si certaines bactéries telles que *Gluconacetobacter xylinus* sont capables de le produire comme exopolysaccharide (Whistler *et al.*, 1993 ; Flemming et Wingender, 2010).

C'est un polymère non ramifié constitué de résidus de D-glucose unis exclusivement par des liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (**Figure 20**). L'unité élémentaire de la cellulose est le cellobiose constitué de deux molécules de D-glucopyranose unies par une liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ( $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranose) (Weinman et Mehul, 2004).

Les résidus D-glucopyranoses (en conformation chaise de type  ${}^4C_1$ ) des chaînes de cellulose établissent de nombreuses liaisons hydrogène intra- et interchaînes (**Figure 21**) ce qui permet aux chaînes de s'organiser en microfibrilles insolubles dans la plupart des solvants. Les liaisons hydrogènes intrachaînes sont localisées d'une part entre l'hydrogène de l'hydroxyle du C-3 d'une unité glucose et l'oxygène du cycle adjacent et d'autre part entre l'oxygène de l'hydroxyle en C-6 d'une unité et l'hydrogène du groupement OH du C-2 de l'unité adjacente. Concernant les liaisons intermoléculaires, elles apparaissent entre l'hydrogène du groupe

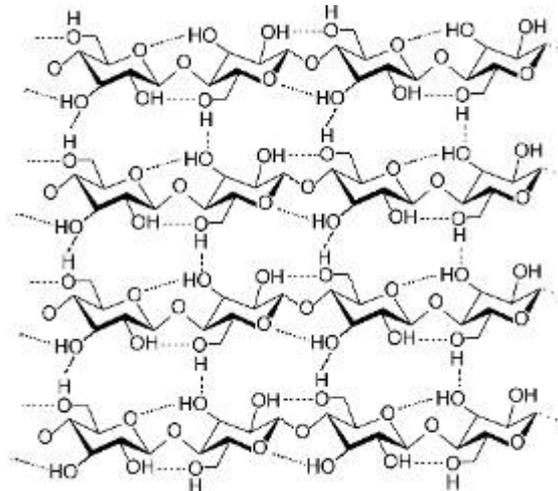
## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

CH<sub>2</sub>OH d'une chaîne et l'oxygène de l'hydroxyle en C-3 d'une autre chaîne. Deux unités glucoses adjacentes sont décalées de 180° l'une par rapport à l'autre ce qui explique la linéarité des chaînes.



**Figure 20: Structure de la cellulose ;  $n$  = degré de polymérisation (dp) (Wondraczek et Heinze, 2015).**

Les microfibrilles de cellulose présentent des régions cristallines et des régions amorphes. Les liaisons hydrogènes sont beaucoup plus nombreuses dans la première. Le taux de cristallinité de la cellulose est de 40 à 50 % pour le bois, 60 % pour le coton et supérieur à 70 % pour certaines algues marines (Lin, 1987).



**Figure 21: Liaisons hydrogènes inter- et intrachânes de cellulose.**

Les microfibrilles font 3 nm d'épaisseur et sont constituées de 36 chaînes de cellulose disposées parallèlement (Somerville, 2006). Les chaînes peuvent contenir jusqu'à 15000 résidus. Les microfibrilles associées confèrent à la plante sa résistance mécanique (Brown, 2004) et servent aussi de structure d'ancrage aux hémicelluloses et aux pectines pour former la paroi cellulaire.

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

La cellulose est un des polysaccharides les plus exploités dans différents domaines tels que l'agroalimentaire, l'industrie chimique, la pharmacie, les biocarburants et pour la production de matières plastiques telles que la cellophane (Simon *et al.*, 1998).

### 1.2.3.1.2. Les Hémicelluloses

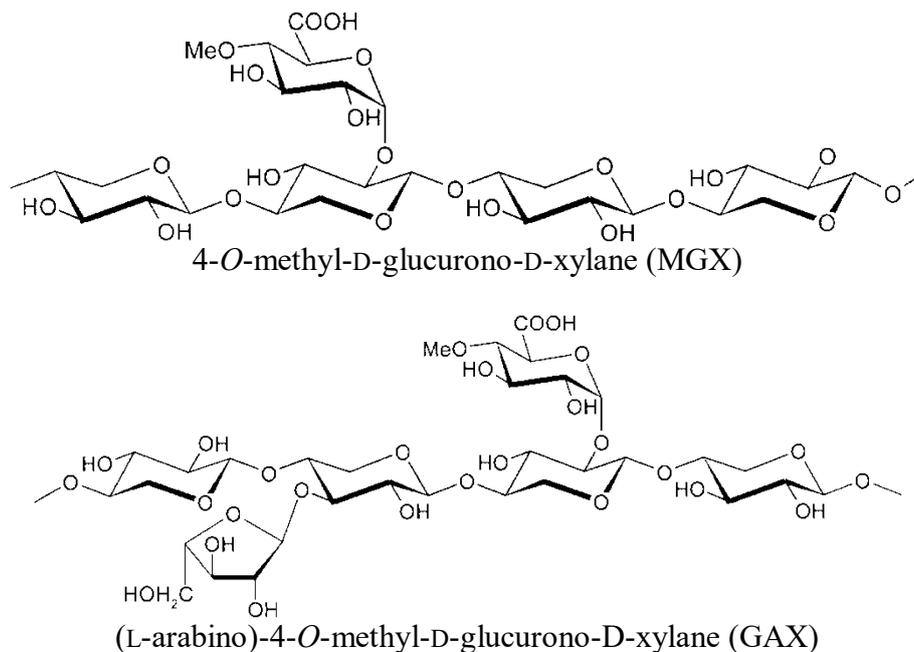
Les hémicelluloses constituent un groupe diversifié de polysaccharides pariétaux insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solutions alcalines (Cosgrove, 1997). Elles s'associent avec les microfibrilles de cellulose pour former un réseau cohésif dans l'architecture de la paroi végétale. Elles représentent entre 20 et 30 % de la masse sèche du bois et jusqu'à 50 % de la masse sèche des graines de céréales. La plupart des hémicelluloses sont constituées d'un squelette de  $\beta$ -(1→4)-glycane de type D-pyranose, où l'O-4 est en position équatoriale (O'Neill et York, 2003). Ce squelette est substitué par différents types de chaînes latérales incluant différents types d'oses tels que du galactose, du mannose, de l'arabinose, du glucose, du xylose de l'acide glucuronique et de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique. Les hémicelluloses sont classées en trois familles principales : les xylanes, les mannanes et les glucanes possédant des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -(1→3) et  $\beta$ -(1→4).

Les trois familles sont-elles mêmes déclinées en sous familles en fonction de leur composition en monosaccharides (glucuronoxylanes, xyloglucanes, glucomannanes, arabinoxylanes, glucuronoarabinoxylanes,...). On trouve les détails de diversité structurale et leur répartition dans différents taxons dans la littérature (York et O'Neill, 2008 ; Burton et Fincher, 2009 ; Faik, 2010 ; Scheller et Ulvskov, 2010 ; Pirslova et Matuslova, 2013). Pauly *et al.* (2013) rapportent que les polymères hémicellulosiques sont fabriqués dans l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de diverses glycosyltransférases et sont ensuite transportés vers la membrane plasmique pour être sécrétées dans la paroi cellulaire. Une fois dans l'apoplaste, elles forment des associations avec les microfibrilles de cellulose. Les hémicelluloses ont diverses fonctions et contribuent au contrôle de l'expansion et de la différenciation de la paroi cellulaire de la plante (Hayashi et Kaida, 2011).

### 1.2.3.1.3. Les Xylanes

Les xylanes sont les hétéropolysaccharides les plus abondants au sein des hémicelluloses. On les trouve dans les parois cellulaires primaires et secondaires des monocotylédones et les parois cellulaires secondaires des dicotylédones (Ebingerrova *et al.*, 2005). Après la cellulose et la chitine ils représentent le troisième polymère le plus abondant de la biosphère. Dans les parois cellulaires, les xylanes contribuent à la réticulation des microfibrilles de cellulose et de la lignine (Imamura *et al.*, 1994 ; Balakshin *et al.*, 2011). En raison de leur réticulation

importante, les xylanes ont un impact majeur sur l'intégrité de la paroi cellulaire et la résistance de la biomasse végétale à la digestion enzymatique (Faik, 2013). Tous les xylanes ont un squelette commun de résidus D-Xyl liés en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), et moins fréquemment en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (surtout chez les xylanes d'algues). Ce squelette peut être substitué en position C-2 par l'acide glucuronique (GlcA) ou l'acide 4-O-méthyl-glucuronique (Me-GlcA) et/ou par des résidus Ara $\beta$  et Xyl en position C-2 et/ou C-3 (**Figure 22**).



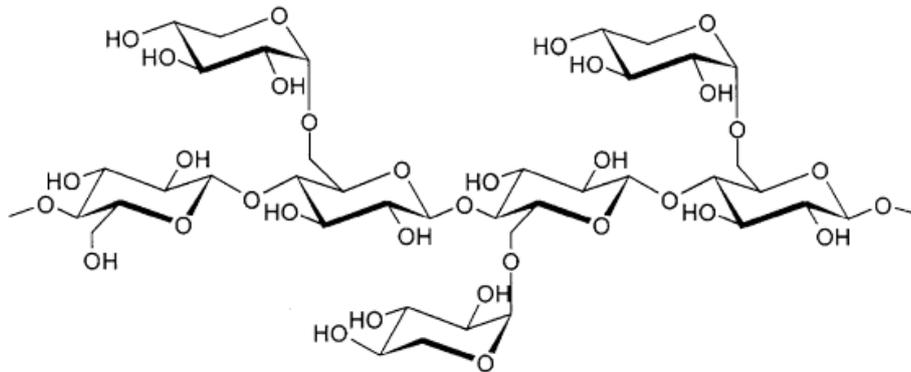
**Figure 22: structure primaire des Xylanes.**

Selon la nature de ces substitutions, les xylanes peuvent être classés en trois catégories ou sous familles (Ebingerrova *et al.*, 2005) : Les méthylglucuronoxylanes (MGX) qui ont un rapport moyen Xyl:MeGlcA de 10:1 et qui se trouvent principalement dans les feuilles ; les arabinoxylanes neutres (AX), qui ont un rapport Ara: Xyl variant de 1:2 à 1:1 et qui sont surtout rencontrés dans les parois des endospermes des céréales ; les glucuronoarabinoxylanes (GAX) qui contiennent des chaînes latérales GlcA, MeGlcA et Ara $\beta$  avec un rapport moyen Xyl:Ara:GlcA de 8:3:1 (**Figure 22**) des dicotylédones présentent un tétrasaccharide complexe de séquence  $\beta$ -D-Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-GalA-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Xyl (Johansson et Samuelson, 1977 ; Anderson *et al.*, 1983; Pena *et al.*, 2007) qui semble absent chez les xylanes de monocotylédones (Ratnayake *et al.*, 2013). Tous les types de xylanes peuvent être variablement acétylés en position O-2 et/ou O-3 (Lee *et al.*, 2014 ; Yuan *et al.*, 2016).

### 1.2.3.1.4. Les glucanes

Les glucanes hémicellulosiques sont en fait des xyloglucanes (XGs) et représentent un groupe important d'hémicelluloses localisées dans les parois cellulaires primaires des dicotylédones

(Carpita et Gibeaut, 1993 ; Faik, 2013) où ils interagissent avec les microfibrilles de cellulose par liaison hydrogène pour former un sous-réseau qui renforce la fonction porteuse de la cellulose dans la paroi (Hayashi *et al.*, 1987). Tous les XG sont constitués d'un squelette de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucane similaire à celui de la cellulose mais ramifié par des résidus Xyl liés en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (**Figure 23**). Jusqu'à 75 % des résidus de la chaîne  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucane peuvent être ramifiés (Hayashi 1989, Fry *et al.*, 1993, Faik *et al.*, 1997, Ray *et al.*, 2004, Hoffman *et al.*, 2005). Les résidus xyl peuvent être en outre substitués par des chaînes latérales de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-D-galactanes (Gal) ou  $\alpha$ -L-fucosyl- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-D-Gal (Fuc-Gal) (Hoffman *et al.*, 2005 ; Albersheim *et al.*, 2010). D'autres monosaccharides mineurs sont également présents dans les chaînes latérales des XGs tels que ceux de type  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) Araf ou 2)- $\beta$ -Araf-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$  (Yorketal, 1996 ; Ray *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2005).



**Figure 23: Structure des xyloglucanes (Ebringerva *et al.*, 2005).**

### 1.2.3.1.5. Les pectines

Les pectines représentent un groupe de polysaccharides contenant de l'acide galacturonique (GalA) très présent dans les parois cellulaires de nombreuses plantes et plusieurs taxons d'algues (Popper *et al.*, 2011). Du fait de l'hétérogénéité structurale de ce type de polysaccharides on parlera des pectines et non pas de la pectine. Les pectines forment une matrice de type gel entourant le sous-réseau "cellulose-hémicellulose" de la paroi cellulaire primaire, comme décrit dans le modèle proposé par Carpita et Gibeaut (1993). Ces polymères se trouvent également dans la lamelle moyenne (McClendon, 1964 ; Yamauchi *et al.*, 1986) qui permet le contact cellule-à-cellule et l'adhérence. Les pectines jouent un rôle important dans la physiologie végétale, y compris en termes de défense, de morphogénèse et de signalisation (Ridley *et al.*, 2001 ; Willats *et al.*, 2001 ; Mohnen 2008 ; Peaucelle *et al.*, 201). Ainsi, les pectines sont une source d'oligogalacturonides (OGAs) susceptibles d'être libérés après une attaque d'agents phytopathogènes. Ils peuvent alors agir en tant qu'éliciteurs des réactions de défense de la plante induisant des réponses incluant l'augmentation du pH

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

extracellulaire, la libération de composés antifongiques tels que des espèces réactives de l'oxygène ou encore la libération d'enzymes de dégradation de la paroi fongique (Lee *et al.*, 1999; Osorio *et al.*, 2008). Les pectines sont des hétéropolysaccharides complexes caractérisés par leur contenu riche en GalA (70 %) (Mohnen, 2008 ; Atmodjo *et al.*, 2013). Cette forte proportion de GalA donne aux pectines une charge nette négative même si une proportion importante d'entre eux sont non chargés car méthylés. Trois grands groupes de structures pectiques se retrouvent au sein du même polymère dans la paroi cellulaire : L'homogalacturonane (HG), le rhamnogalacturonane I (RG-I), et le rhamnogalacturonane II (RG-II) (Mohnen, 2008 ; Caffall et Mohnen 2009 ; **Figure 24**).

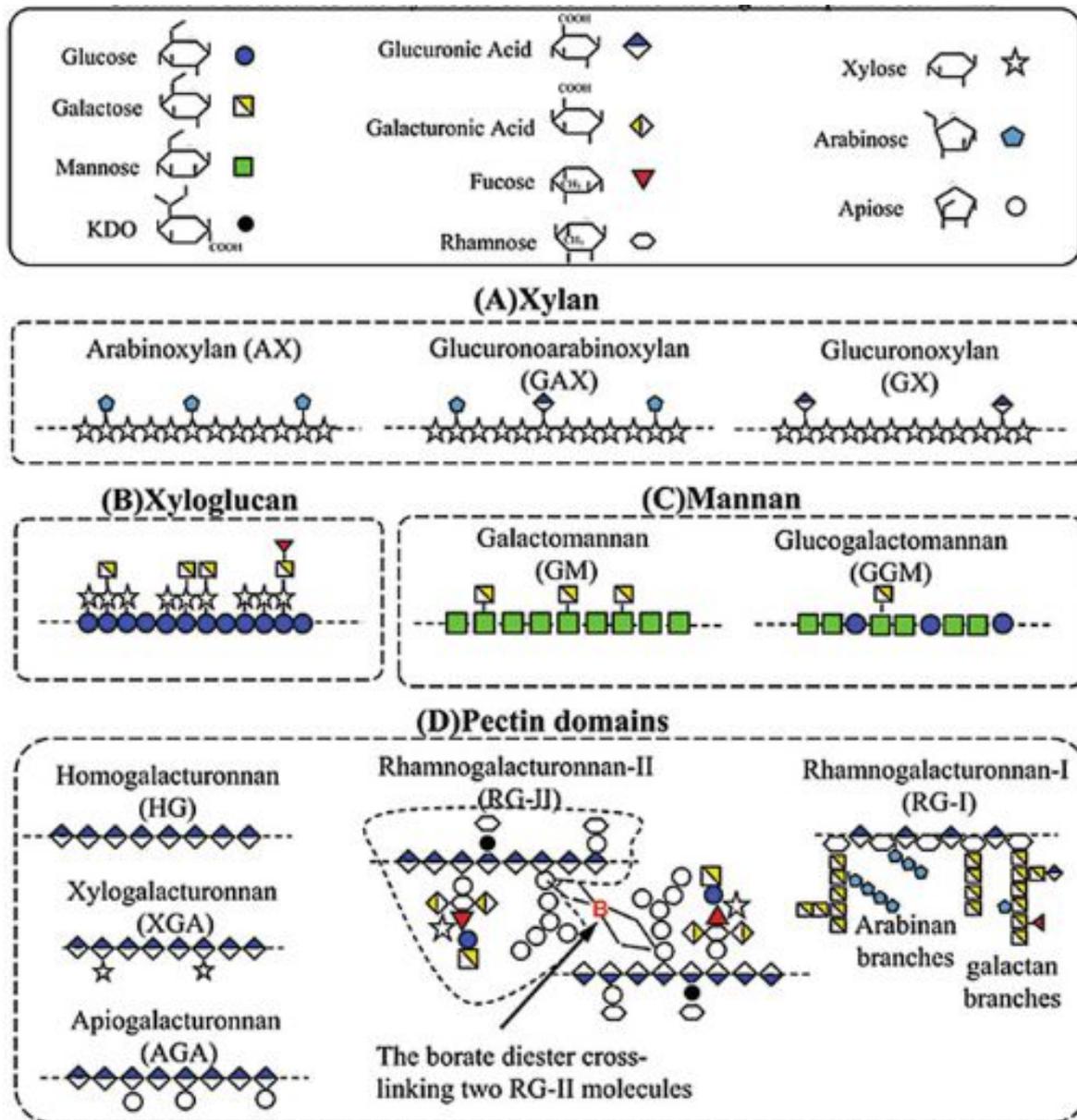
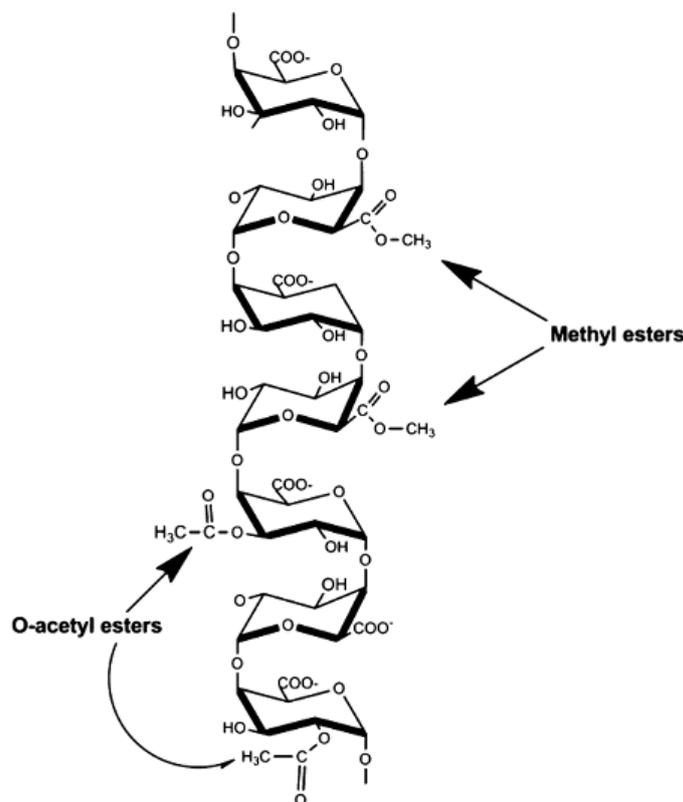


Figure 24: Structures des hémicelluloses et des pectines (Ramawat et Merillon 2015).

Le groupe le plus abondant au sein des pectines (~ 65 % de la pectine totale) est l'HG, qui est un homopolymère linéaire de résidus de GalA liés en  $\alpha$ -(1→4) (**Figure 25**).



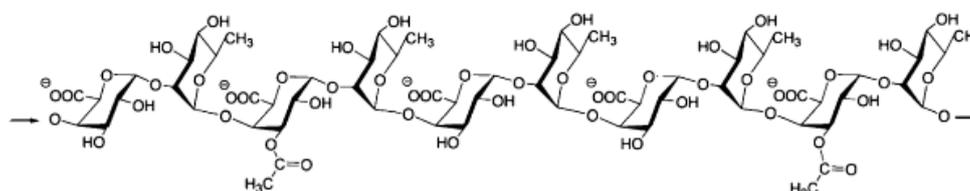
**Figure 25: Structure des homogalacturonanes (HG) (Ochoa 2012)**

Plus de 80 % de résidus de GalA de HG sont estérifiés par du méthanol en C-6 ce qui fait de la pectine native une pectine hautement méthylée (Sterling *et al.*, 2001). L'HG peut également être acétylés aux positions O-2 et O-3 à des degrés divers en fonction des espèces végétales (**Figure 25**) (Mohnen, 2008). L'HG peut également être substitué par des résidus Xyl et sera alors qualifié de xylogalacturonane (XGA) (Ovodova *et al.*, 2000).

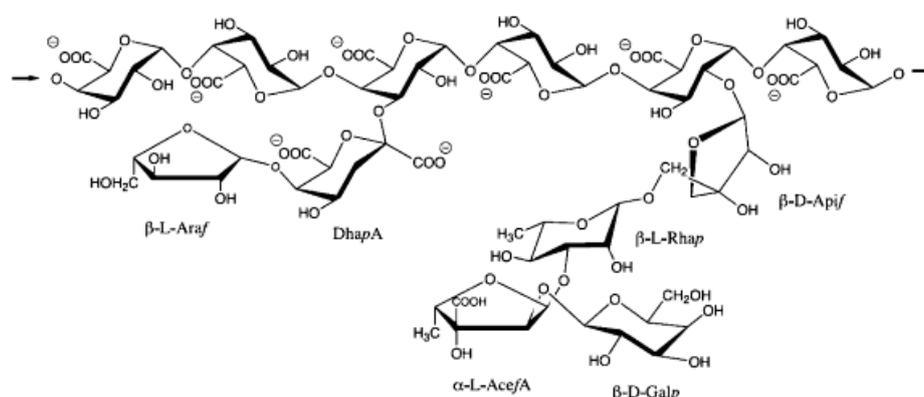
Le deuxième polymère pectique le plus abondant est le RG-I (~ 20-35 % de la pectine totale). Ce polysaccharide est constitué d'un chaîne principale de 4)- $\alpha$ -D-GalA-(1→2)- $\alpha$ -L-Rha-(1→ (**Figure 26**). Les résidus Rha de cette chaîne principale de RG-I sont variablement ramifiés par des oligosaccharides de plusieurs types : L-Araf-(1→5)- $\alpha$ -L-Araf-(1→2)- $\alpha$ -L-Araf-(1→3)- $\beta$ -Gal-(1→4),  $\beta$ -Gal-(1→6)- $\beta$ -Gal-(1→4),  $\beta$ -Gal-(1→6)- $\beta$ -Gal-(1→4)- $\beta$ -Gal-(1→4), et  $\alpha$ -L-Fuc-(1→2)- $\beta$ -Gal-(1→4)- $\beta$ -Gal-(1→4)-Rha (**Figure 26**) (Mcneil *et al.*, 1980; Lau *et al.*, 1985).

Le troisième composé pectique est composé des RG-II (**Figure 27**) qui représentent seulement 10 % de la pectine totale mais sont connus pour leur complexité structurale. Ils ont un squelette de résidus de GalA liés en  $\alpha$ -(1→4) similaire à celui des HG mais ce dernier est ramifié par au moins quatre types d'oligosaccharides (qualifiés de chaînes latérales A, B, C et

D-) (**Figure 28**). La chaîne latérale A (un octasaccharide) et la chaîne latérale B (un nonasaccharide) sont liées aux résidus de GalA en C-2 tandis que les chaînes C et D (des disaccharides) sont liées au C-3 des GalA (Ishii et Matsunaga, 1996 ; O'Neill *et al.*, 2001; Matsunaga *et al.*, 2004).



**Figure 26: Structure des RG-I (Wong, 2008)**



**Figure 27: Structure des RG-II (Wong, 2008)**

Une faible proportion de RG-II contient de l' $\alpha$ -D-apiose (un pentose de type 3-hydroxyméthyle-D-érythrose) pour former un polymère appelé apiogalacturonane (AGA) (Duff, 1965 ; Hart et Kindel 1970 ; Longland *et al.*, 1989; Mcneil *et al.*, 1984). Les résidus d'apiose dans les RG-II sont d'importants points de réticulation (Stevenson *et al.*, 1988) *via* des ions borate avec lesquels ils forment des diesters cycliques (Ishii *et al.*, 1999). La réticulation RG-II/borate est critique pour l'intégrité structurale de la paroi cellulaire (O'Neill *et al.*, 2001). Des liaisons covalentes relient les HG à RG-I, RG-II et XGA (Nakamura *et al.*, 2002; Zandleven *et al.*, 2007; Round *et al.*, 2010; Atmodjo *et al.*, 2013). La Figure 24D montre une présentation schématique des domaines HG, RG-I, RG-II, AGA et XGA de polymères pectiques.

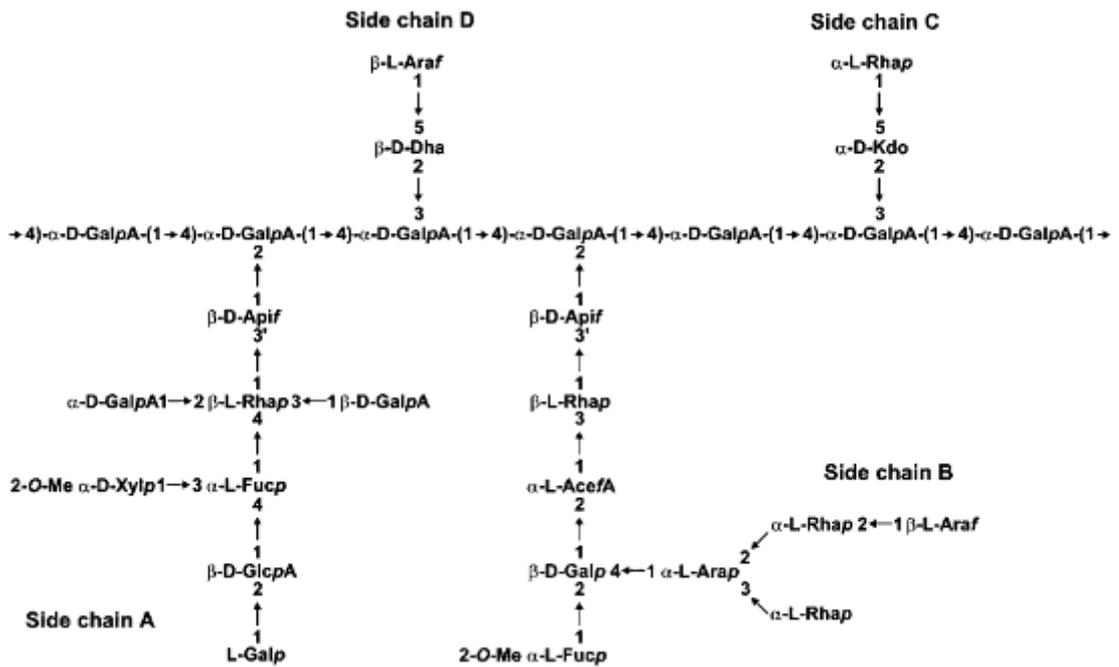


Figure 28: Chaînes latérales (A-D) de RG-II isolée à partir des parois cellulaires d'un angiosperme (Matsunaga *et al.*, 2004).

### 1.2.3.2. Les polysaccharides de réserves

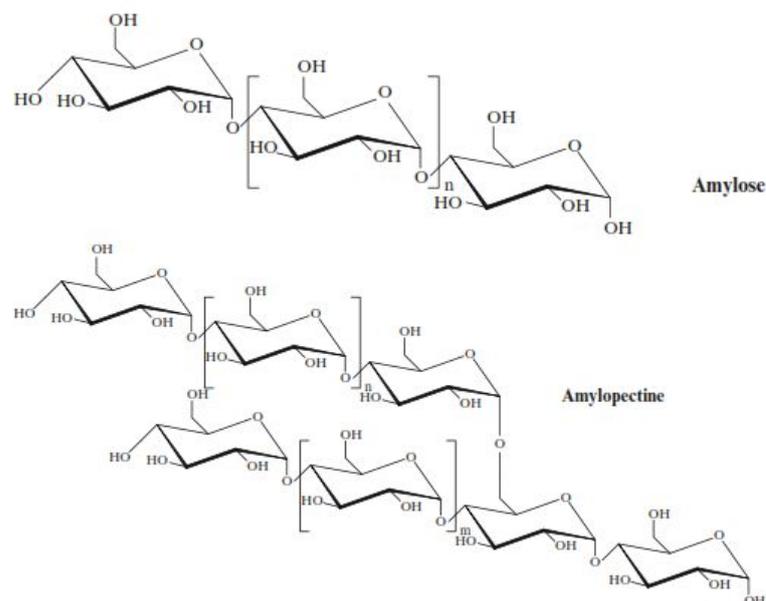
Les plantes stockent des polysaccharides comme réserve. Les plus importantes de ces réserves sont les amidons, les fructanes, les mannanes et les galactomannanes.

#### 1.2.3.2.1. L'amidon

L'amidon est le réservoir d'hydrates de carbone le plus abondant dans les plantes où il est présent dans des graines ou des tubercules. La composition de l'amidon a été initialement déterminée en étudiant le résidu de son hydrolyse totale par la  $\beta$ -amylase. Il est constitué principalement de deux macromolécules glucosidiques, à savoir l'amylose et l'amylopectine (Figure 29). Dans la plupart des types communs d'amidon, la teneur en amylopectine se situe entre 72 % et 82 %, alors que la teneur en amylose est comprise entre 18 % et 28 % (Dufresne, 2015). L'amylose est un polymère linéaire constitué d'unités glucose liées par des liaisons glycosidiques de type  $\alpha$ -(1→4). Il a un degré de polymérisation pouvant atteindre 6000 et une masse molaire comprise entre  $10^5$  et  $10^6$  g/mol. Les chaînes peuvent facilement former des hélices simples ou doubles. L'amylopectine est un polymère hautement ramifié constitué de chaînes relativement courtes de  $\alpha$ -D-(1→4) glucanes qui sont interconnectées par des liaisons glycosidiques de type  $\alpha$ -(1→6). Il s'agit d'une grande molécule qui diffère de l'amylose par la présence de ramifications  $\alpha$ -(1→6) toutes les 24-30 unités glucose. Chaque

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

molécule d'amylopectine contient jusqu'à deux millions de résidus glucose dans une structure compacte. Les macromolécules d'amylopectine sont orientées radialement dans le granule d'amidon ce qui conduit à la formation d'une alternance de régions concentriques de structures amorphe et cristalline (Dufresne, 2015).



**Figure 29: Structures de l'amylose et de l'amylopectine (Dufresne 2015).**

L'amidon est utilisé dans de nombreuses applications alimentaires et non-alimentaires. Sous sa forme native, l'amidon est utilisé comme épaississant (potages, sauces, ...) pour le coffrage et le capsulage, comme gélifiant et comme stabilisant (de par sa grande capacité de rétention d'eau). L'amidon peut aussi être modifié selon différentes voies pour lui donner de nouvelles fonctions. La modification physique ou chimique de l'amidon affecte sa viscosité et donc sa stabilité au pH et à la chaleur. L'amidon peut être hydrolysé en dérivés par voie enzymatique ou chimique (dégradation acide). L'amidon peut être aussi pré-gélatinisé pour lui assurer une meilleure dissolution au cours de la fabrication d'un produit et pour son utilisation dans les produits froids. La taille des granules de nombreux amidons contribue à leurs viscosités, leur vitesse et température de gélatinisation. Plus le granule d'amidon est gros, plus la viscosité devient importante. Les ingrédients préparés à partir d'amidon ont souvent plus d'une fonction. Par exemple, le phosphate d'amidon (E1410) sert de stabilisateur mais aussi d'épaississant ou de liant. Une autre utilisation commune des amidons est la substitution des matières grasses, des édulcorants, et l'amélioration de la tenue au chauffage ou au cisaillement, la prévention de l'hydratation indésirable des aliments, et l'apport de texture au produit.

### 1.2.3.2.2. Les mannanes

Les mannanes, sont des polysaccharides qui sont à la fois décrits comme des hémicelluloses et des polysaccharides de stockage dans les paroi cellulaire des graines des plantes (Buckeridge *et al.*, 2000). Ils sont divisés en plusieurs groupes incluant des galactomannanes (GM), des glucomannanes et des galactoglucomannanes. La forme galactomannane est la plus répandue chez les végétaux. Les galactomannanes sont constitués d'une chaîne principale de type  $\beta$ -(1→4)-D-mannane substituée variablement en C-6 par des résidus galactose. Le rapport M/G d'un galactomannane ainsi que la taille des chaînes macromoléculaires peuvent varier au sein d'une même espèce végétale en fonction des conditions climatiques, de la composition du sol, et de l'espèce (Bouzouita *et al.*, 2007 ; Dakia, 2009; McCleary, 1980 ; Moreira *et al.*, 2008). Les glucomannanes sont constitués d'une alternance de résidus D-mannopyranoses et D-glucopyranoses liés en  $\beta$ -(1→4). Le rapport G/M varie ici encore en fonction des espèces (on les trouve dans la paroi cellulaire des cellules de bois). Enfin, les galactoglucomannanes, qui correspondent au glucomannane précédent substitué en C-6 par des résidus galactose sont particulièrement abondants dans la paroi primaire des cellules de Solanacées. Les galactoglucomannanes se trouvent principalement dans l'endosperme des graines, comme polysaccharides de stockage chez de nombreuses plantes, telles que les légumineuses et les palmiers (Buckeridge *et al.*, 2000a, Dhugga *et al.*, 2004).

### 1.2.3.2.3. Les galactomannanes (GM)

Les GM sont des polysaccharides de masse moléculaire élevée issus d'endospermes de graines de certaines *Leguminosae* (appartenant à la famille des *Fabaceae*) où ils servent de réserve de carbone et d'énergie lors de la germination (Prajapatiet *et al.*, 2013). De par leurs nombreuses propriétés physico-chimiques ils sont abondamment utilisés pour diverses applications.

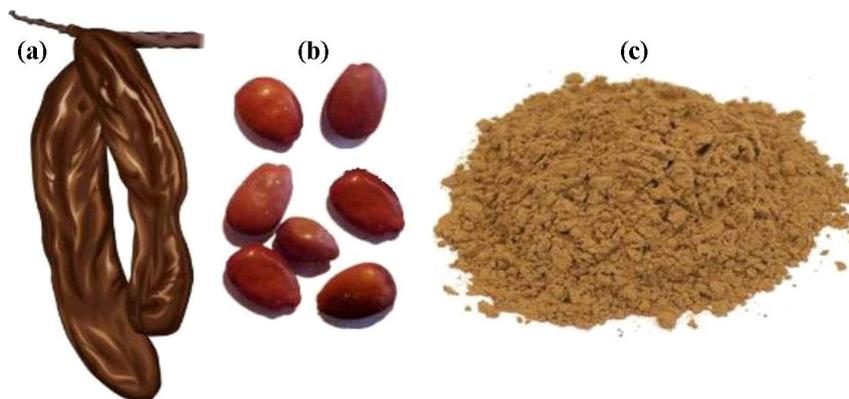
#### 1.2.3.2.3.1. Les principaux GM valorisés

Quatre gommes principales sont utilisées actuellement, bien que de nombreuses autres espèces puissent fournir des hydrocolloïdes valorisables. Il s'agit de la gomme de caroube (Locust bean gum en anglais ou LBG) provenant des graines de *Ceratonia siliqua* (caroubier), de la gomme de guar provenant des graines de *Cyamopsis tetragonoloba*, de la gomme tara provenant des graines de *Cesalpinia spinosa*, et de la gomme cassia provenant de graines de *Cassia obtusifolia*. La préparation des gommes comprend le décorticage des graines, un premier broyage pour enlever l'embryon et collecter l'endosperme qui est ensuite récupéré et

soumis à un second boryage pour produire de la farine brute. La farine peut être purifiée par dissolution dans de l'eau chaude, filtration et précipitation'éthanolique (Tomasik, 2004).

### 1.2.3.2.3.1.1. La gomme de caroube

En Méditerranée et au Moyen-Orient, la gomme de caroube est utilisée dans les préparations alimentaires traditionnelles. A noter également que ses vertus médicinales datent de l'Antiquité. Ses gousses (**Figure 30a**) sont mélangées à d'autres ingrédients comme le miel, la bouillie d'avoine et la cire pour traiter la diarrhée et d'autres affections, comme l'infection oculaire, les troubles visuels et l'infestation par des parasites intestinaux. Au Maroc, les Berbères consomment les fruits du caroubier sous la forme de boissons pour soulager les maux liés à la digestion. Dans certains pays, la farine de caroube (**Figure 30c**) intervient dans l'alimentation infantile pour remplacer la farine de blé dans le lait en poudre du fait de sa faible teneur en allergènes et sa teneur élevée en éléments nutritifs (Silveira *et al.*, 2011). La gomme de caroube a un rapport galactose/mannose (G/M) de 1:4 et une masse moléculaire de l'ordre de  $30 \times 10^4$  g/mol. La rhéologie de cette gomme montre un comportement typiquement pseudoplastique qui diminue avec la température (Gillet, 2014). La solubilité de cette gomme dans l'eau froide est faible. L'augmentation de la température favorise la solubilisation de polymères riches en «zones lisses» c'est-à-dire peu branchées qui ont tendance à s'agréger et s'enchevêtrer, formant ainsi un réseau dense et des solutions très visqueuses, même à faible concentration du fait d'interactions limitées avec les molécules d'eau (Gillet, 2014).



**Figure 30: Gomme de caroube. (a) gousses, (b) graines et (c) farine (Prajapati *et al.*, 2013).**

Bien que la gomme de caroube ne forme pas de gels, elle peut être utilisée conjointement avec d'autres hydrocolloïdes comme le xanthane, les agars, les carraghénanes et le furcellarane pour former des gels. Cette propriété a été attribuée à la capacité des groupements galactose à former des liaisons hydrogène avec les régions hélicoïdales d'autres hydrocolloïdes ce qui conduit à la réticulation du mélange (Venkataraju *et al.*, 2007). La gomme de caroube (E410)

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

est largement utilisée comme épaississant et stabilisant dans de nombreux aliments, tels que les crèmes glacées, les tartinables, les assaisonnements pour salades, et les produits de la charcuterie.

### 1.2.3.2.3.1.2. La gomme guar

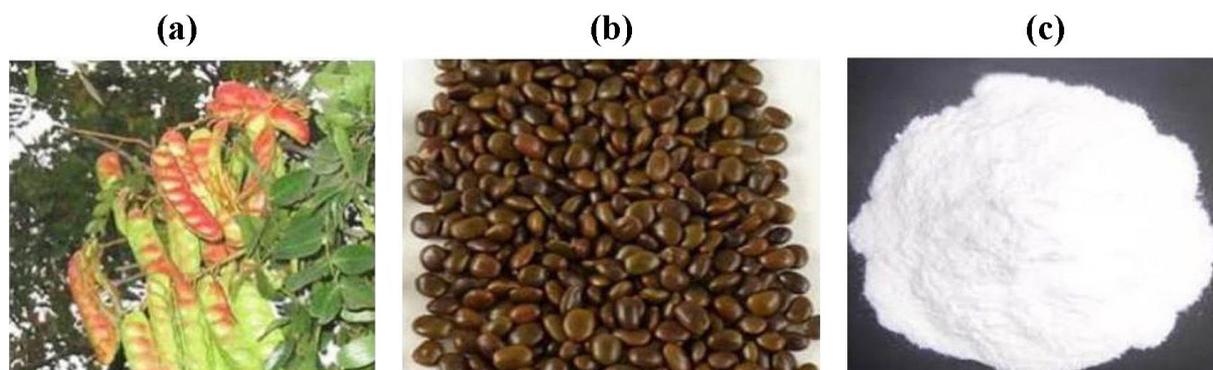
La gomme guar (**Figure 31**) est principalement produite dans le sud des États-Unis. Elle a longtemps été utilisée comme ingrédient alimentaire en Inde. A la suite de la seconde guerre mondiale la gomme guar a connu un développement sur le plan commercial et s'est révélée compétitrice de la gomme de caroube. Le guar est un mannane linéaire avec une proportion plus élevée de galactoses ramifiés que la gomme de caroube (rapport G/M de 1:2), ce qui se traduit par une meilleure solubilisation dans l'eau y compris à des températures inférieures à 20 °C. La rhéologie de la gomme de guar est similaire à celle de la gomme de caroube. Les solutions de ce polysaccharide ont un comportement pseudoplastique décroissant avec l'augmentation de la température et présentent une bonne stabilité dans une large gamme de pH. Comme pour la gomme de caroube, l'association avec certains polysaccharides tels que le xanthane peut conduire à la formation de gels. Cependant ces derniers sont moins rigides que ceux obtenus avec la gomme de caroube dans des conditions similaires du fait de l'étendue réduite des régions non ramifiées. Les utilisations de la gomme de guar sont semblables à celles de la gomme de caroube.



**Figure 31: Gomme de guar (a) gousses, (b) graines et (c) farine (Prajapati *et al.*, 2013)**

### 1.2.3.2.3.1.3. La gomme de tara

La gomme de tara (**Figure 32**) a un rapport G/M de 1:3, intermédiaire entre celui de la gomme de caroube et de la gomme de guar. Les propriétés rhéologiques des solutions de cette gomme sont semblables à celles de la gomme de caroube. Bien que disponible dans le commerce, la gomme de tara ne semble pas avoir d'applications spécifiques. Elle constitue juste une alternative à l'utilisation d'autres GM.



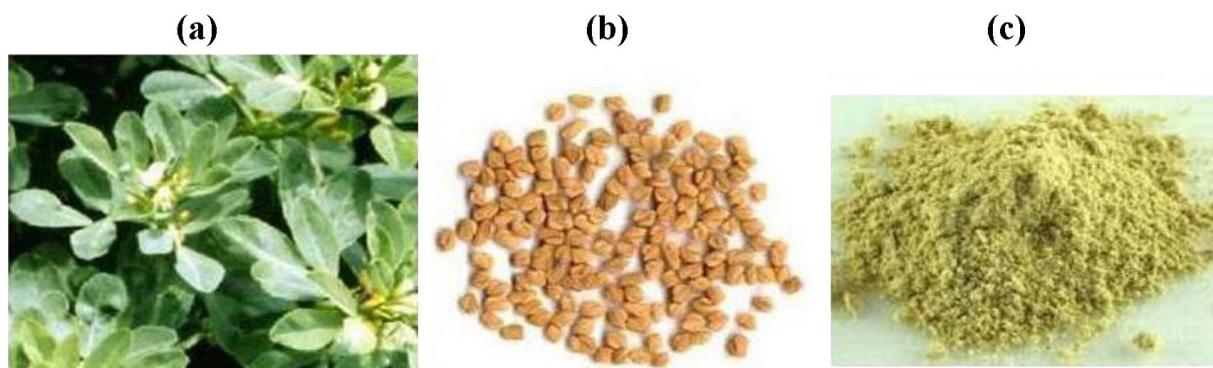
**Figure 32: Gomme de tara. (a) gousses, (b) graines et (c) farine (Prajapati *et al.*, 2013).**

### 1.2.3.2.3.1.4. La gomme cassia

La gomme cassia a un rapport moyen de galactose-mannose de 1:5 et peut être solubilisée seulement après l'ébullition, lorsqu'une solution à haute viscosité peut être obtenue. La structure de la gomme est plutôt variable et des fractions de solubilités différentes sont obtenues en raison de différents degrés de substitution de galactose.

### 1.2.3.2.3.1.5. La gomme fenugrec

Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) (**Figure 33**), une autre légumineuse de la région méditerranéenne, contient un GM avec un rapport de G/M approchant 1:1,41. Cette gomme est soluble dans l'eau à des températures inférieures à 20 °C et forme des solutions à viscosité inférieure de celles des autres GM à concentration équivalente. Cette gomme développe des propriétés émulsifiantes.



**Figure 33: Gomme de fenugrec (a) la plante, (b) graines et (c) farine (Prajapati *et al.*, 2013).**

### 1.2.3.2.3.2. Structures et propriétés des GM

D'après Buckeridge *et al.* (2000), la première publication sur la structure des GM est celle de Nadelman *et al.*, (1890) qui signale la présence de galactose et de mannose dans plusieurs espèces de légumineuses. Cet auteur a également reporté pour la première fois le caractère visqueux des polymères hydrosolubles issus de ces plantes. Avec le développement des techniques de détermination de la nature des liaisons glycosidiques par les techniques de

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

dérivatisation des glucides, principalement pendant la seconde moitié du 20<sup>ième</sup> siècle, les structures des GM provenant de plusieurs sources ont été déterminées. Il est maintenant clair que la majorité de ces macromolécules, lorsqu'elles sont d'origines végétales ont une structure polymérique ramifiée constituée d'un squelette de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannane avec des unités latérales de galactose liées au mannose par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Le rapport moyen G/M varie d'environ 1 à 10, selon les espèces végétales (**Tableau 6**) (Crescenzi *et al.*, 2004 ; Wei *et al.*, 2015).

**Tableau 6: Rendements et rapports de M/G pour des GM extraits de différentes graines d'espèces appartenant au genre *Astragalus* et à quelques légumineuses.**

Espèces	rendement %(m/m)	Ratio M/G	Références
<i>Astragalus cicer</i> L.	15,8	1,3	Tookey <i>et al.</i> , (1962)
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.	16,0	1,2	
<i>A. nuttallianus</i> DC.	20,5	1,4	
<i>A. sinicus</i> L.	19,2	1,6	
<i>A. tenellus</i> Bunge	19,0	1,4	Anulov <i>et al.</i> , (1995)
<i>A. falcatus</i> Lam.	5,5	1,3	
<i>A. lehmannianus</i> Bunge	11,5	1,3	
<i>A. tibetanus</i> Benth. Ex Bunge	5,4	1,1	Smimova <i>et al.</i> , (1998)
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (caroube)	38,0	3,8	Smith (1948)
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (guar)	35,0	1,5	Anderson <i>et al.</i> (1949)
<i>Trigonella foenum graecum</i>		1,1	Reid <i>et al.</i> (1970)

source : (Buckeridge *et al.*, 2000)

Les résidus d' $\alpha$ -D-galactopyranose dans les chaînes latérales impactent la solubilité de façon importante. La solubilité dans l'eau des GM augmente avec la teneur en galactose (c'est-à-dire avec un rapport M/G décroissant), vraisemblablement parce que les résidus galactose inhibent l'acquisition d'une structure ordonnée des chaînes de mannane et contribuent à l'entropie conformationnelle à l'état liquide par rotation libre de ces mêmes résidus autour des liaisons (1 $\rightarrow$ 6). Un taux de substitution de galactose de 10 % est nécessaire pour à la solubilité dans l'eau des GM. En dessous de ce pourcentage, les GM en solution précipitent, même à température ambiante, en raison de l'association des régions non substituées du polymère. des fractions de rapports M/G différents peuvent être obtenues par dissolution à des températures progressivement plus élevées puis re-précipitation après élimination des fractions insolubles (Srivastava *et al.*, 2005). Le rapport M/G des GM dépend de l'espèce. Il est également un bon indicateur de l'origine de ces espèces. Les GM sont extraits en phase aqueuse à différentes températures (entre 20 et 90 °C) pendant quelques heures puis précipités par addition d'alcools polaires. Le méthanol ou l'éthanol sont les plus couramment utilisés à raison de 3 volumes pour 1 volume. Le précipité est collecté par centrifugation ou filtration puis séché

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

sous vide, à l'étuve ou lyophilisé. Cette méthode d'extraction est particulièrement adaptée aux GM de l'endosperme des graines de légumineuses après séparation manuelle de l'embryon (Klose et Glicksman, 1968 ; Dea et Morrison 1975 ; Panegassi, 2000). Cette étape peut être réalisée en incubant les graines dans de l'eau à 100 °C ou de l'alcool jusqu'à ce que l'imbibition soit suffisante pour la séparation manuelle des composants des graines. Cette méthode est très utilisée pour la séparation de l'embryon dans l'exploitation du fenugrec et constitue une étape importante de la purification de cette gomme.

En fonction de la source végétale d'origine, les galactomannanes peuvent être contaminés lors de leur extraction par d'autres polysaccharides de la paroi cellulaire (Buckeridge *et al.*, 1990). Une seconde étape de purification est alors nécessaire et en faisant appel à une seconde précipitation alcoolique ou par addition d'une solution de liqueur de Fehling, qui précipite sélectivement les GM en formant un complexe bleu. Après lavage de ce complexe et acidification (HCl). Il est possible de le dissocier pour obtenir un GM de haut degré de pureté. A noter que toutes ces purifications secondaires se traduisent par des pertes significatives de rendement. Cette contamination par d'autres polysaccharides végétaux lors des extractions est particulièrement vérifiée pour les GM issus de parois végétales qui présentent un certain degré d'interaction avec d'autres polysaccharides tels que les hémicelluloses. À mesure que le nombre d'espèces de légumineuses étudiées augmente et que les techniques d'analyse de la structure fine des polysaccharides s'améliorent, certaines variations de la structure générale des GM ont été identifiées. Parmi elles on trouve la description de liaisons  $\beta$ -(1→2) ou  $\beta$ -(1→3) dans la chaîne principale ou la présence de chaînes courtes de galactane en  $\alpha$ -(1→2) et  $\alpha$ -(1→6) (Unrau *et al.*, 1970 ; Kapoor *et al.*, 1971). Olennikov *et al.*, (2008) ont réalisé une extraction aqueuse des polysaccharides des graines d'*Astragalus sericeocanus* Gontsch. (Fabaceae). Ils ont ainsi isolé avec un rendement de 3,6 % un GM de masse moléculaire 876 kDa et de viscosité intrinsèque  $[\eta] = 764,6$  mL/g. Le polysaccharide possédait un rapport M/G de 1,58. La spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  a établi que ce M/G contenait des unités de mannobiose et de galactose substituées de manière différente : (Gal) Man-Man, et/ou Man-Man (Gal) en plus de (Gal) Man-Man (Gal) avec un ratio de 15 ; 51 et 34 % respectivement (Olennikov et Rokhin 2008). Les mêmes auteurs ont isolé en 2009 un GM de rapport M/G égal à 1,4 et de masse moléculaire 472 kDa à partir des graines d'*A. danicus* Retz (Fabaceae). Une autre étude sur des graines d'*A. cicer* L. (Fabaceae) a permis d'extraire à l'eau avec un rendement de 5,9 %, un GM de rapport M/G de 1,39, de masse moléculaire 1064 kDa et de viscosité intrinsèque égale à 925,5 mL/g. Le ratio des unités de mannobiose de type Man-Man, (Gal) Man-Man/Man-Man (Gal) et (Gal) Man-Man (Gal) étaient respectivement de 18,7, 19,8 et

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

61,5 %. Enfin, un GM extrait de graines d'*A. lehmannianus* avec rendement de 4,8 % présentait un rapport M/G de 1,22 une masse moléculaire de 997,03 kDa et une viscosité intrinsèque  $[\eta]=868,4$  mL/g. Seules 78 % des unités mannose étaient substituées en C-6 par du galactopyranose. La distribution du galactose le long de la chaîne a pu être calculée à partir des spectres RMN comme étant égale par paire d'unités de mannose à deux galactoses, un galactose et aucun galactose avec des pourcentages de distribution de respectivement 65,3, 31,5 et 3,2 %.

### 1.2.3.2.3.3. Métabolisme des galactomannanes

#### 1.2.3.2.3.3.1. Accumulation et biosynthèse

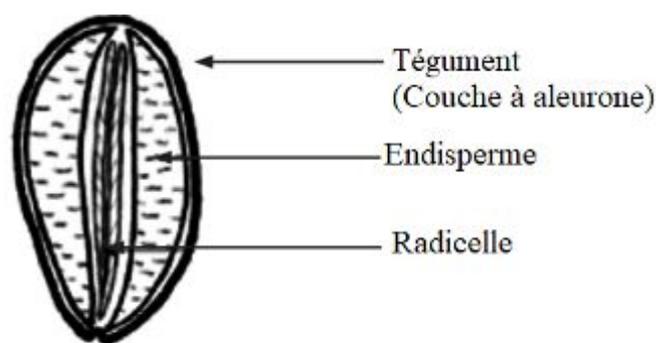
Nadelman (1890) a observé que les GM présents dans les endospermes de graines de *Colutea breviata*, *Indigofera hirsuta*, *Tetragonolobus purpureus* et *Trigonella foenum graecum* ont d'abord été formés sous la forme de vacuoles et ensuite déposés dans la paroi cellulaire de l'endosperme. En 1970, Reid et Meier ont observé que le dépôt d'oligosaccharides tels que le stachyose dans des graines de *T. foenum-graecum* se faisait pendant la phase de maturation au même moment que celui du GM. Ce phénomène a conduit ces auteurs à suggérer que ce polysaccharide pourrait être synthétisé par un mécanisme similaire à la synthèse de ces oligosaccharides. Après sa synthèse le GM peut subir une phase de maturation qui tend ou non à modifier sa structure. Ainsi pendant la maturation des graines de fenugrec le rapport M/G du GM semble constant (Reid et Meier 1970). Par contre Dey (1978), Mallett *et al.*, (1889) et Courtois *et al.* (1970) ont constaté une augmentation de ce rapport M/G dans les graines de différentes espèces de légumineuses durant cette phase de maturation. Chez *Gleditsia triacanthos*, une variation de la teneur en galactose du GM des graines de 41 % à 35 % a été observée lors de son dépôt alors qu'il est resté constant dans celui de *Gleditsia ferox*. De plus, Mallet *et al.* (1987) ont observé que la distribution de la taille du GM accumulé dans les graines devenait plus dispersée lors du dépôt. Le dépôt de GM lors du développement des graines de légumineuses a été étudié en détail chez le fenugrec par Meier *et al.*, (1977). Ces auteurs ont observé que le GM synthétisé est associé à l'espace intracisternal du réticulum endoplasmique rugueux puis sécrété au niveau des parois cellulaires. Bien que Sioufi *et al.* (1970) aient détecté la présence d'UDP-galactose et de GDP-mannose dans des graines de *T. foenum-graecum*, ce n'est qu'en 1982 que Campbell et Reid ont montré que des fractions particulières obtenues à partir d'endospermes de graines de fenugrec se comportaient comme un réticulum endoplasmique. Après leur extraction par ultracentrifugation ces particules étaient capables de transférer le  $[^{14}\text{C}]$ -mannose du GDP-[U- $^{14}\text{C}$ ]-mannose à un polysaccharide

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

hydrosoluble qui ne pouvait pas être distingué du GM. Afin de comprendre le processus de biosynthèse des GM avec des rapports de M/G différents pendant le développement de la graine, Edwards *et al.*, (1992) ont réussi à isoler des enzymes spécifiques à partir de l'endosperme du fenugrec et de la gomme guar impliquées dans la formation du polysaccharide à partir soit du GDP-mannose (associé à des ions bivalents tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ ) ou un mélange de GDP-mannose et UDP-galactose. Ces enzymes se sont révélées être une galactosyltransférase et une mannosyltransférase. Aucun transfert de galactosyle n'a été observé sans la présence de GDP-mannose, ce qui indique que l'activité de la galactosyltransférase dépend de la formation de la chaîne de mannane. Ces mêmes auteurs ont effectué une étude comparative en utilisant des graines de fenugrec (M/G = 1,1), guar (M/G = 1,6) et *Senna occidentalis* (M/G = 3,3). Ils ont suivi la teneur en GM et l'activité de la galactosyltransférase et la mannosyltransférase, impliqués dans le transfert de mannosyl- et galactosyl pendant la maturation des graines de trois espèces et ont constaté que les taux de galactosyltransférase et mannosyltransférase augmente pendant la période où la vitesse de la formation du GM est la plus élevée. Alors que les rapports M/G pour le fenugrec et le guar étaient constants pendant toute la période de développement, le rapport M/G est passé d'environ 2,3 à 3,3 dans les graines de Senna. Cette augmentation a été associée à une augmentation concomitante d'une activité  $\alpha$ -galactosidase dans l'endosperme. Sur la base de ces résultats, les auteurs ont conclu que, dans le fenugrec et le guar, le contrôle du rapport M/G est basé uniquement sur le processus de biosynthèse, alors que dans le Senna, la production de GM est probablement contrôlée par le processus de biosynthèse au début de la maturation puis par un processus de déramification qualifié de « débranchage ». Aquila (1995) a signalé une augmentation drastique du rapport M/G dans le développement de graines de *Senna macranthera* var. *nervosa*, ce qui confirme ces résultats.

Toutes les graines (**Figure 34**) contiennent des réserves de nature glucidique (amidon, GM,...), qui seront utilisées par l'embryon dans la première phase de la germination, avant que l'appareil photosynthétique ne soit différencié. L'utilisation de cette réserve est appelée mobilisation. Dans les graines de fenugrec et de guar, l'endosperme n'est pas vivant et les cellules sont presque entièrement remplies de GM (Buckeridge *et al.*, 2000).



**Figure 34: Coupe transversale d'une graine de caroube (d'après Dakia *et al.*, 2008).**

Dans les graines de ces espèces, une couche d'aleurone est présente qui est censée être responsable de la production des enzymes hydrolytiques qui favorisent la rupture des polysaccharides de stockage après la germination (Buckeridge *et al.*, 2000). Dans les graines de *C. siliqua*, les cellules endospermatiques sont vivantes et le GM joue le rôle d'un « épaisseur » de paroi. Dans ce cas, il n'y a pas de distinction claire entre l'endosperme et la couche aleurone et les enzymes sont probablement produites et libérées dans les parois cellulaires par les cellules endospermiques.

Bien qu'un grand nombre d'espèces végétales renferment du GM dans leurs graines, seuls quelques travaux ont étudié le métabolisme post-germinatif de ces graines en détail. Parmi les légumineuses, les espèces les plus étudiées sont le guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) et le Caroube (*Ceratonia siliqua*). Dans ces espèces, le GM est dégradé par trois hydrolases : une  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22), une endo- $\beta$ -mannanase (EC 3.2.1.78) et une  $\beta$ -mannosidase (EC 3.2.1.25). La mobilisation du GM dans d'autres légumineuses a également été étudiée (Reid *et al.*, 1972 ; McCleary et Matheson, 1976 ; Buckeridge et Dietrich, 1996) confirmant la présence et l'intervention des trois enzymes mentionnées ci-dessus. Dans tous les cas étudiés, le polysaccharide est hydrolysé en mannose et galactose en même temps que du saccharose est produit dans l'endosperme par inter conversion du galactose en glucose par un UDP-galactoépimérase, et du mannose en fructose par un mannose isomérase. Le saccharose est issu du mannose et du galactose hydrolysés et est consommé par l'embryon en croissance. De l'amidon également issu de ces sucres hydrolysés est stocké de façon transitoire dans les cotylédons (Reid, 1971 ; Buckeridge et Dietrich, 1996). Dirk *et al.* (1999) ont proposé que la dégradation de la paroi cellulaire et la synthèse de l'amidon puissent être liées.

McCleary et Matheson (1983) ont effectué des études sur le devenir des produits issus de la mobilisation de GMs. Ils ont détecté des activités phosphomannoisomérase et phosphoglucoisomérase dans l'endosperme de la graine et ont suggéré que ces enzymes sont

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

probablement responsables de l'épimérisation du mannose en glucose utilisé pour la synthèse du saccharose dans l'endosperme. Les mêmes auteurs ont également montré que des embryons de plantule en croissance alimentés par du galactose et du mannose radiomarqués présentaient des métabolites radiomarqués montrant la capacité de ces organismes à utiliser les produits issus de l'hydrolyse des GMs (McCleary 1983). McCleary et Matheson (1974) ont détecté des formes multiples d' $\alpha$ -galactosidases dans des graines de guar, mais une seule d'entre elles est associée à l'endosperme. Overbeeke *et al.*, (1989) a démontré expérimentalement que cette  $\alpha$ -galactosidase une fois purifiée est constituée d'un seul polypeptide de 40,5 kDa capable d'hydrolyser les résidus galactose présents sur la chaîne de mannane. McCleary (1983) a purifié une endo- $\beta$ -mannanase de guar et montré que son activité sur le GM conduisait à la production d'un mélange d'oligosaccharides. Reid et Edwards (1995) ont souligné le fait que cette endo- $\beta$ -mannanase agit comme une véritable mannanase et que son action hydrolytique sur les GM est entravée par la substitution du galactose. Cela souligne l'importance du « débranchage » préalable du polymère et explique probablement les niveaux très élevés d'activité  $\alpha$ -galactosidase trouvées lors de la mobilisation du GM *in vivo* dans des espèces contenant des polymères hautement substitués. McCleary et Matheson (1982) ont purifié une exo- $\beta$ -mannanase à partir de graines de guar. Cette enzyme s'est révélée spécifique des manno-oligosaccharides et ne présentait pas d'activité sur le polymère (McCleary, 1983). Sur la base de ces résultats, les auteurs ont suggéré que cette enzyme a pour fonction d'hydrolyser les manno-oligosaccharides produits par l'action concertée de la galactosidase et de l'endo- $\beta$ -mannanase. Les principales voies biochimiques impliquées dans le catabolisme du GM et de ses produits par l'embryon sont présentées en **Figure 35**.

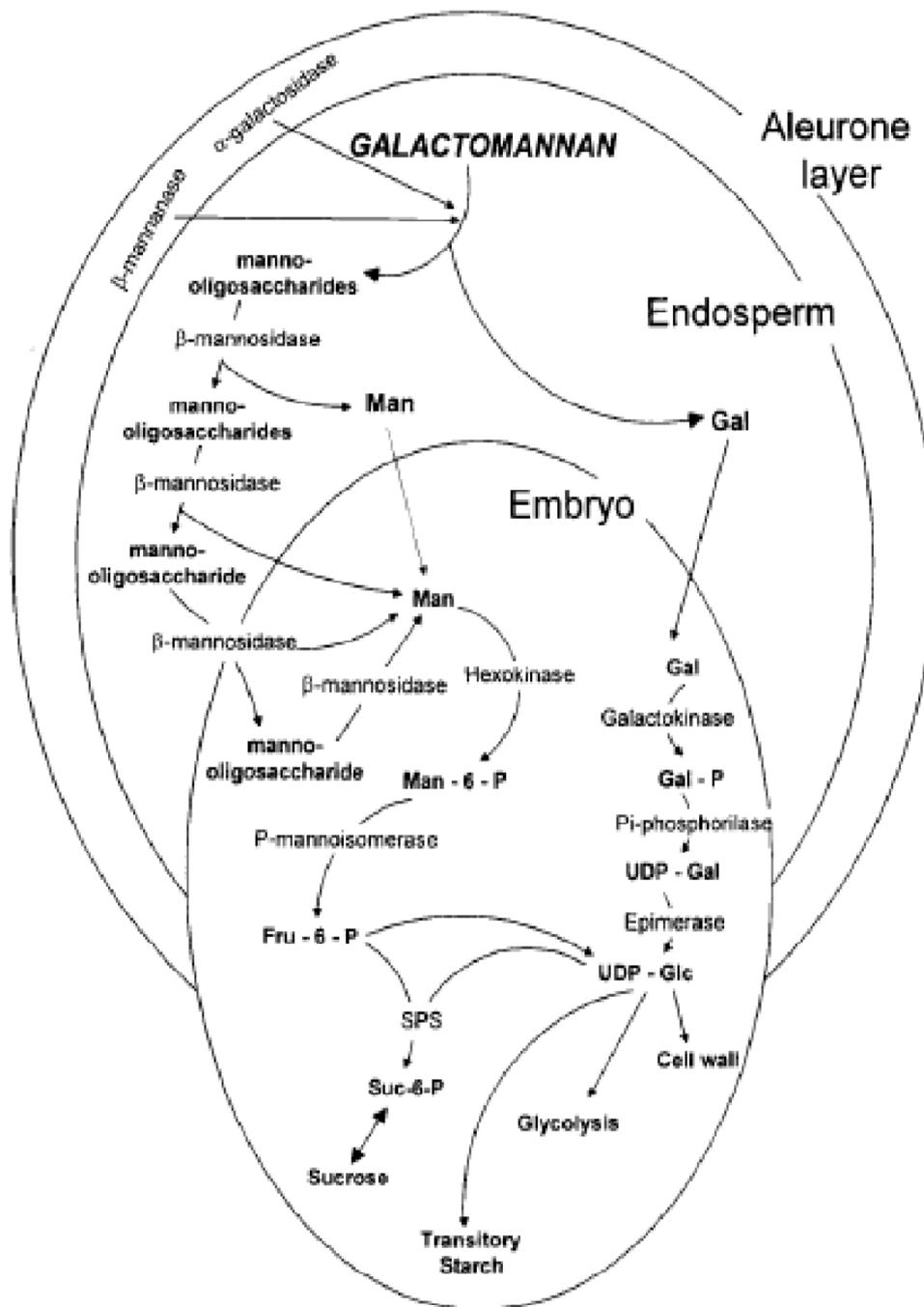


Figure 35: Voies biochimiques impliquées dans le catabolisme du GM et de ses produits par l'embryo.

#### 1.2.3.2.3.3.2. Les fonctions biologiques des GMs dans la paroi cellulaire.

Le degré et/ou le positionnement des résidus galactose sur le squelette mannane a un rôle fondamental dans la relation structure-fonction. Lorsque la ramification du galactose s'approche de zéro (mannanes purs), leur fonction biologique semble être plus liée à la dureté des tissus. On le voit clairement dans les *Palmae* et dans d'autres espèces non légumineuses. A l'inverse, avec des degrés plus élevés de galactosylation (le fenugrec étant l'un des cas extrêmes), la fonction biologique du GM comprend la rétention hydrique et le stockage

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

---

d'énergie. La fonction de stockage semble la plus importante. Cependant, il est important de se rappeler que certaines légumineuses appartenant à la sous-famille *Faboideae*, comme le soja par exemple, stocke des quantités relativement faibles de galactomannanes dans un endosperme rétréci (Dea et Morrison, 1975). Selon Polhill *et al.* (1981) il existe une tendance évolutive dans la famille *Leguminosae*. Celle-ci tend vers l'accumulation de réserves dans les cotylédons. En général, les graines provenant d'espèces appartenant à la sous-famille *Caesalpinioideae*, considérée comme la plus primitive, ont tendance à accumuler de grandes quantités de GM dans leurs parois endospermiques. Dans cette sous-famille, il est également possible d'observer que certaines tribus (*Amherstieae* et *Detariae*) ont tendance à ne pas avoir d'endosperme (rétréci pendant la maturation) et à accumuler de gros dépôts de xyloglucanes dans leurs parois cellulaires (*Copaifera*, *Hymenaed*). Bien que la germination dans ces deux tribus soit épigée, il y a peu de gonflement des cotylédons. On pense que la sous-famille *Caesalpinioideae* est originaire des régions tropicales chaudes et humides, mais après le Crétacé, il y a eu une vaste désertification des terres limitant les espèces de cette sous-famille aux régions tropicales moins nombreuses (Cowan, 1981). Certains auteurs pensent que les deux autres sous-familles de *Leguminosae*, à savoir *Mimosoideae* et *Faboideae* se sont développées à partir des *Caesalpinioideae*. Les espèces appartenant à la sous famille des *Mimosoideae* sont restées strictement tropicales mais les *Faboideae* (ou *Papilionoideae*) sont plus omniprésentes. Elles contiennent des espèces bien adaptées aux régions tropicales et d'autres aux régions tempérées ou proches du désert (Polhill *et al.*, 1981). Dans cette sous-famille, il est possible de trouver des espèces ou des tribus entières avec des quantités élevées de GM stockées dans les parois cellulaires très épaisses de l'endosperme (*Crotalarieae* et *Robinieae* notamment).

En analysant les données disponibles dans la littérature, concernant le rendement en GM et les rapports M/G, les études indiquent assez clairement que lorsque le rendement diminue chez les *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et les *Faboideae*, le degré de ramification par le galactose du GM augmente. Il est donc raisonnable de présumer qu'il existe une pression sélective pour préserver la solubilité des GMs dans l'eau. Pour comprendre un tel processus, les chercheurs ont comparé la situation écologique dans laquelle sont les espèces tropicales telles que celles appartenant aux sous familles *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae* (sols chauds et humides de forêts), avec les conditions environnementales dans lesquelles se développent certaines espèces de *Faboideae* (lisière de déserts). Dans les forêts tropicales, la fonction de stockage de glucides énergétiques semble être importante. Du fait de la biodiversité de ces biotopes, les graines sont caractérisées des contenus importants en GMs peu ramifiés. A l'inverse les

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

---

graines de certaines espèces de *Faboideae* contiennent des GMs très ramifiés et donc très solubles qui semblent être favorisés dans les environnements où l'eau est disponible en faible quantité et sur des temps courts.

Il est donc raisonnable de supposer qu'il existe une pression sélective des espèces pour préserver la fonction de la solubilité des GMs dans l'eau. Dans les forêts tropicales, les graines sont riches en GMs peu ramifiés et s'hydratent lentement avec une quantité finale d'eau absorbée plus faible par rapport à celles des graines contenant des GMs hautement ramifiés. A l'inverse les graines contenant des GMs hautement ramifiés mais en quantités faibles absorberaient l'eau de manière plus rapide et plus importante. Ceci est considéré comme un avantage pour les graines qui germent dans des environnements secs dans lesquelles l'eau peut être disponible pour un temps relativement court (Buckeridge *et al.*, 2000). Comme indiqué ci-dessus, bien que l'anatomie de la graine varie d'une espèce à l'autre, l'endosperme entoure complètement l'embryon dans tous les cas étudiés, suggérant qu'il est un organe à double fonction servant à la fois à distribuer l'eau uniformément pendant la germination mais également à mobiliser le GM (après sa dégradation) après la saillie radriculaire lors de la germination en vue d'alimenter l'embryon. Compte tenu de ces données, de nombreux auteurs supposent que la structure et la distribution du GM au sein des *Leguminosae* représentent deux étapes différentes de transfert de fonctions. Ces auteurs ont montré que, après le transfert des GMs des parois cellulaires primaires dans certaines tribus de *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae*, caractérisé par une forte augmentation du taux de galactomannane de forte ramification du mannane par le galactose. La modification des fonctions physiologique du galactomannane depuis la fonction structure vers une fonction de stockage/défense caractérise cette étape de transfert. La deuxième étape de ces changements dans les fonctions physiologiques des galactomannanes, touche probablement la fonction du stockage qui va être modifiée vers une fonction d'absorption d'eau, d'où dans certaines tribus de *Faboideae*, le rendement en galactomannane est relativement faible et la ramification du galactose atteint un maximum de 100%.

### **1.2.3.2.3.4. Les application industrielle des galactomannanes**

Les GMs sont essentiellement utilisés dans les industries alimentaire et pharmaceutique (Mathur, 2011). Les applications industrielles (**Tableau 7**) croissantes de ces gommés dans le domaine du papier, du textile, du pétrole, dans l'industrie pharmaceutique a donné lieu à la recherche de nouvelles sources de GMs et de produits dérivés (Singh *et al.*, 2010).

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

**Tableau 7: Sources commerciales et alternatives de GMs et leurs applications possibles.**

Espèce de GM	Applications	Références
<i>Ceratonia siliqua</i> (locust bean gum)	Thixotrope, liant, stabilisateur, lubrificateur	Prado <i>et al.</i> , (2005)
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Thixotrope, liant, stabilisateur, lubrificateur	Cerqueira <i>et al.</i> , (2009)
<i>Gleditsia triacanthos</i>	Stabilisateur, épaississant, émulsifiant	Bourbon <i>et al.</i> , (2010)
<i>Cesalpinia spinosum</i> (tara gum)	Stabilisateur, épaississant, émulsifiant	Prado <i>et al.</i> , (2005)
<i>Dimorphandra gardneriana</i> Tul	Stabilisateur, épaississant, émulsifiant	Cunha <i>et al.</i> , (2009)
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (guar gum)	Stabilisateur, épaississant, émulsifiant, agent raffermissant	Prado <i>et al.</i> , (2005)
<i>Adenanthera pavonina</i>	Stabilisateur, épaississant, émulsifiant	Cerqueira <i>et al.</i> , (2009)
<i>Prosopis pallida</i> (mesquite gum)	Stabilisateur, épaississant	Chaires-Martinez <i>et al.</i> , (2008)
<i>Mimosa scabrella</i>	Stabilisateur, épaississant	Vendruscolo <i>et al.</i> , (2005)
<i>Trigonella foenum-graecum</i> (fenugreek gum)	Stabilisateur, épaississant	Prado <i>et al.</i> , (2005)

Prajapati *et al.*, (2013)

Les GMs sont normalement stables dans une large gamme de pH et ont de bonnes interactions avec les constituants organiques, inorganiques et alimentaires. Ils sont biocompatibles, bon marché et facilement disponibles. Comme matériaux naturels, ils ont des avantages par rapport aux produits synthétiques, car ils sont chimiquement inertes, non toxique, moins coûteux, biodégradables et largement disponibles (Prajapati *et al.*, 2013). L'absence de toxicité des GMs favorise également leur utilisation dans les industries textile, pharmaceutique, biomédicale, cosmétique et alimentaire (Srivastava *et al.*, 2005). Ils sont principalement utilisés dans la technologie pharmaceutique et la cosmétique, et non comme des galactomannanes pures, mais comme une farine brute. Les farines commercialement vendues contiennent environ 85 % GMs (Pollard *et al.*, 2008). Les ont parfois été utilisés dans des mélanges binaires avec d'autres polysaccharides tels que la gomme xanthane, l'agar et le kappa-carraghénane pour former des gels avec de nouvelles propriétés (Rinaudo *et al.*, 2009). Ils trouvent des applications comme excipients et agents de formulation dans le domaine biomédical, dans les formulations pharmaceutiques de comprimés et dans des systèmes de délivrance de médicament contrôlés par voie orale (SDMO), mais aussi comme agents liants, ou désintégrant, agents de suspension, épaississants, gélifiants, et stabilisants (Meghwal et Oswami, 2012). Les GMs sont également de plus en plus consommés sous forme de fibres

alimentaires pour diminuer l'apport en calories et pour réduire et contrôler la glycémie, Le cholestérol et les niveaux (Murthy *et al.*, 2010).

### 1.2.3.3. Exsudats et mucilages

Les gommages et les mucilages ont certaines similitudes. Le terme "gomme" est utilisé pour décrire un groupe de polysaccharides d'origine naturelle qui trouvent des applications industrielles généralisées en raison de leur capacité, soit à former des gels et à stabiliser des émulsions. Ce sont des hydrocolloïdes végétaux généralement de nature hétéropolysaccharidiques partiellement anioniques pour la plupart (Jani *et al.*, 2009).

Les gommages sont des produits exsudés suite à une blessure de la plante ou en raison de conditions défavorables comme la sécheresse (formation extracellulaire) (Jani *et al.*, 2009).

La gomme tragacanth est un exsudat obtenu à partir de la sève mucilagineuse séchée de tiges et de branches d'*Astragalus gummifer* et d'une vingtaine d'espèces de plantes du genre *Astragalus* appartenant à la famille Leguminosae. Cette sève est obtenue après incision des plantes. Cette gomme contient deux fractions dont l'une, de tragacanthine, constituant environ 8-10 % de la gomme, est soluble dans l'eau. La partie insoluble dans l'eau est connue sous le nom de bassorine (60-70 %). L'hydrolyse de cette gomme donne de l'acide galacturonique, du D-galactopyranose, du L-arabinose, du D-rhamnose et du D-xylopyranose. Elle est également utilisée comme agent émulsifiant, de suspension et d'épaississement et de liaison (Verbeken *et al.*, 2003). Les mucilages sont généralement des produits normaux du métabolisme, formés à l'intérieur de la cellule (formation intracellulaire) et/ou sont produits sans dommage pour la plante (Jani *et al.*, 2009). Bien que le rôle biologique des mucilages dans les semences de plantes est encore incertain, il est probablement associé à la protection contre la dessiccation de la plantule au cours de la germination. Un des composants majeurs des mucilages est la pectine présente dans toutes les parois cellulaires (Wu *et al.*, 2009).

La graine de lin *Linum usitatissimum* (Linaceae) (Warrand, 2004), contient un mucilage sous-utilisé, mais à fort potentiel industriel qui constitue 10 % de la masse de la graine et est localisé dans la couche la plus externe de l'enveloppe de la graine. Deux fractions de polysaccharides hétérogènes constituent le mucilage : une fraction d'arabinoxylane neutre (75 %) et une fraction de rhamnogalacturanane (25 %) (Comin *et al.*, 2015). Le mucilage de moutarde est une fraction de polysaccharide isolée à partir de la moutarde jaune *Sinapis alba* L. (Brassicaceae). Il est obtenu par une hydrolyse enzymatique (pectinase) et une précipitation au sulfate d'ammonium. Cette fraction est principalement composée d'une chaîne de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucane (61,1 %). Cependant, d'autres monosaccharides tels que le Gal (13,8 %), le

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

---

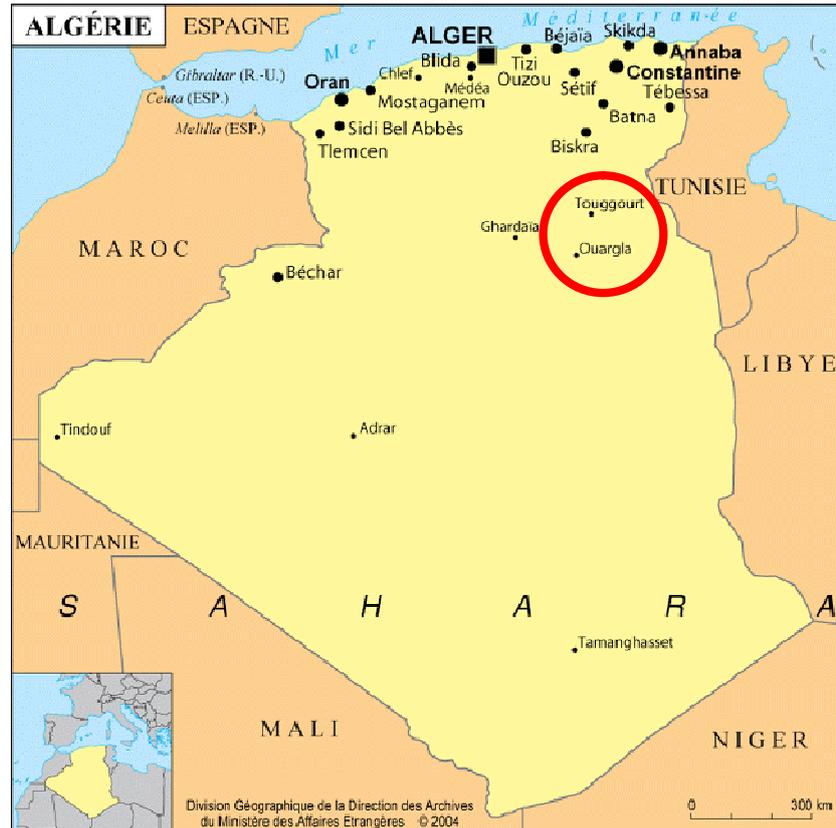
Rha (4,5 %), le Man (13,1 %), le Xyl (7,5 %) et de l'acide uronique (6,9 %) ont également été détectés comme oses constitutifs (Wu *et al.*, 2009).

**CHAPITRE 2**  
**MATERIELS ET METHODES**

### 2.1. Préparation du matériel biologique

Notre étude porte sur une plante spontanée à caractère médicinal : *Astragalus gombo* Cosse and Dur (Bunge) présente dans le Sahara septentrional Est algérien.

La plante a été récoltée en mai 2015 dans la wilaya de Ouargla en Algérie (**Figure 36**). Cette région est située à une altitude de 134 m, aux longitudes 31°54' à 32°1' Nord et latitudes de 5°15' à 5°27' Est (Hamdi-Aissa *et al.*, 2004).



**Figure 36: Situation géographique de la zone de récolte.**

Les tiges, gousses et racines d'*Astragalus gombo* Bunge ont été séchées à température ambiante (35 à 40 °C) pendant deux semaines jusqu'à stabilisation de leur masse sèche. Les gousses remplies de graines d'*A. gombo* sont conservées dans des sachets en papier kraft. Elles sont transportées au laboratoire et conservées dans un endroit frais et sec à l'abri de la lumière. Les graines ont été isolées manuellement à partir des gousses sèches.

Les tiges, les racines et les graines sont broyées en fine poudre (<500 µm) à l'aide d'un broyeur mécanique (Blended 800 ES). Les poudres sont conservées dans un endroit frais et sec à l'abri de la lumière.

### 2.2. Extraction et purification des polysaccharides d'*Astragalus gombo*

#### 2.2.1. Extraction des polysaccharides hydrosolubles issus des tiges

Trente g de poudre de tiges d'*Astragalus gombo* sont décolorées par traitement à l'acétone (750 mL) pendant 4 h sous agitation (500 rpm) à température ambiante (22 °C). Après centrifugation (10000 g, 15 minutes, 20 °C) le culot est traité à l'éthanol absolu (400 mL) pendant 2 h sous agitation (500 rpm) à 80 °C. Après centrifugation (10000 g, 15 minutes, 20 °C) le culot est séché dans une étuve ventilée (40 °C, 1 nuit). La poudre dépigmentée est conservée dans un endroit frais et sec à l'abri de la lumière. Différentes extractions sont réalisées sur les tiges dépigmentées afin d'extraire différentes familles de polysaccharides (**Figure 37**). Les protocoles sont décrits ci-dessous.

##### **Extraction à l'eau distillée (pH=5,9) :**

Dans un ballon, suspendre la poudre de tiges dépigmentée (25 g) dans de l'eau distillée (375 mL). La suspension est agitée (500 rpm) pendant 4 heures à 100 °C sous reflux (**Figure 37**). Le mélange est ensuite refroidi à 4 °C dans un bain de glace puis filtré à travers une passoire à mailles fines munie d'une toile de filtration (porosité de 5 µm) pour retirer les débris macroscopiques insolubles. Le filtrat (**filtrat 1**) est conservé à 4°C et l'insoluble est retraité comme précédemment à reflux dans de l'eau distillée (375 mL) à 100 °C pendant 4 heures pour récupérer le maximum de polysaccharides (épuisement). La suspension est alors refroidie à 4 °C dans un bain de glace puis filtrée à travers une passoire à mailles fines munie d'une toile de filtration (porosité de 5 µm). Le filtrat (**filtrat 2**) est mélangé avec le filtrat 1 puis le mélange est centrifugé (10000 g, 15 minutes, 20 °C) à l'aide d'une centrifugeuse (BECKMAN COULETR, anti-J-E, centrifuge). Le surnageant obtenu est ensuite filtré sous vide à l'aide d'un verre fritté (porosité n° 1, 500 mL) muni d'une couche de terre de diatomée (hauteur de 5 cm). Le filtrat obtenu est concentré au tiers du volume initial sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor RII- BUCHI) à une température de 65 °C. Les polysaccharides présents dans le concentrât sont alors précipités par trois volumes d'éthanol 96 % (-20 °C) sous agitation (350 rpm) pendant 30 minutes puis récupérés par centrifugation (10000 g, 15 minutes, 4 °C). Le culot obtenu est lavé successivement par de l'éthanol (500 mL) puis de l'acétone (500 mL). Le culot est finalement séché à 45 °C pendant 24 heures dans une étuve puis broyé par un mortier en une poudre fine de couleur brune (**PS1**).

##### **Extraction à la soude (pH= 12,3) :**

Dans un ballon, suspendre la poudre de tiges dépigmentée (25 g) dans une solution de soude (NaOH 50 mM, 375 mL). La suspension est agitée (500 rpm) pendant 4 heures à 100 °C sous

reflux. Le mélange est ensuite refroidi à 4 °C dans un bain de glace puis filtré à travers une passoire à mailles fines munie d'une toile de filtration (porosité de 5 µm) pour retirer les débris macroscopiques insolubles. Le filtrat (**filtrat 1**) est neutralisé avec une solution d'acide chlorhydrique (1 M) puis conservé à 4 °C et l'insoluble est retraité comme précédemment à reflux par une solution de soude (50 mM) à 100 °C pendant 4 heures pour récupérer le maximum de polysaccharides (épuisement). La suspension est alors refroidie à 4 °C dans un bain de glace puis filtrée à travers une passoire à mailles fines munie d'une toile de filtration (porosité de 5 µm). Le filtrat (**filtrat 2**) est neutralisé avec une solution d'acide chlorhydrique (1 M) puis mélangé avec le filtrat 1. Le mélange est centrifugé (10000 g, 15 minutes, 20 °C). Le surnageant obtenu est ensuite filtré sous vide à l'aide d'un verre fritté (porosité n° 1, 500 mL) muni d'une couche de terre de diatomée (hauteur de 5 cm). Le filtrat obtenu est concentré au tiers du volume initial sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor RII- BUCHI) à une température de 65 °C. Les polysaccharides présents dans le concentrât sont alors précipités par trois volumes d'éthanol 96 % (-20 °C) sous agitation (350 rpm) pendant 30 minutes puis récupérés par centrifugation (10000 g, 15 minutes, 4 °C). Le culot obtenu est dissous dans l'eau distillée (150 mL) puis précipité avec de l'éthanol (500 mL) afin d'éliminer les sels formés (NaCl) et finalement centrifugé (10000 g, 15 minutes, 4 °C). Cette étape de dissolution du culot dans l'eau et de précipitation à l'éthanol est répétée 3 fois (un suivi conductimétrique est réalisé au cours du dessalage). Le culot final est lavé successivement par de l'éthanol (500 mL) puis de l'acétone (500 mL). Le polysaccharide est finalement séché à 45 °C pendant 24 heures dans une étuve puis broyé par un mortier en une poudre fine de couleur brune (**PS2**).

### **Extraction à l'acide chlorhydrique (pH= 1,3) :**

Cette extraction est réalisée en suivant un protocole adapté du protocole d'extraction en conditions alcalines en remplaçant cette fois la solution de soude 50 mM par une solution d'acide chlorhydrique 50 mM. La neutralisation des filtrats est ici réalisée à l'aide d'une solution de soude (1 M). La purification du polysaccharide est réalisée par précipitation alcoolique et lavage à l'acétone comme décrit précédemment. Le polysaccharide obtenu par extraction acide est nommé **PS3**.

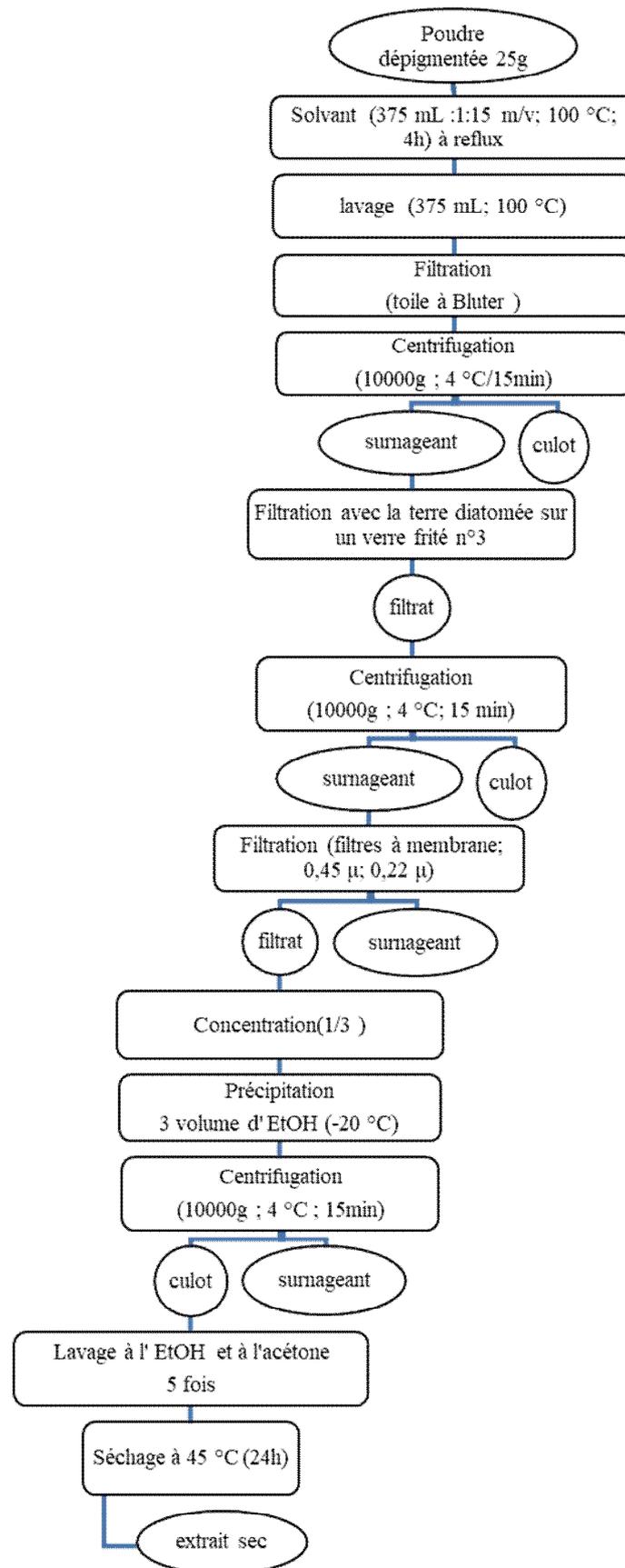


Figure 37: Extraction aqueuse à pH neutre, acide et alcalin des polysaccharides des tiges d'*Astragalus gombo*.

### 2.2.2. Extraction des polysaccharides hydrosolubles issus des graines d'*Astragalus gombo*

Dans un ballon, suspendre la poudre de graines (30 g) dans de l'eau distillée (2250 mL). La suspension est agitée (500 rpm) pendant 2 heures à 60 °C sous reflux. Le mélange est ensuite refroidi à 4°C dans un bain de glace puis centrifugé (20000 g, 15 minutes, 4 °C). Le surnageant (**surnageant 1**) est conservé à 4°C et l'insoluble est retraité comme précédemment à reflux dans de l'eau distillée (2250 mL) à 60 °C pendant 2 heures pour récupérer le maximum de polysaccharides (épuisement). La suspension est alors refroidie à 4 °C puis centrifugée (20000 g, 15 minutes, 4 °C). Le surnageant (**surnageant 2**) est mélangé avec le surnageant 1 puis l'ensemble est filtré sous vide à l'aide d'un verre fritté (porosité n°3, 500 mL) pour éliminer les particules insolubles résiduelles. Le filtrat obtenu est concentré 10 fois sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor RII- BUCHI) à une température de 65 °C.

Le concentrât est refroidi à 4 °C dans un bain de glace puis les protéines sont précipitées par ajout d'acide trichloroacétique (4 % m/v) sous agitation (500 rpm). Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation (20000 g, 15 minutes, 4 °C). Le surnageant est neutralisé par une solution de soude (1 M) puis les polysaccharides sont précipités par trois volumes d'éthanol 96 % à -20 °C sous agitation (350 rpm) pendant 30 minutes avant d'être collectés par centrifugation (10000 g, 15 minutes, 4 °C). Le culot est redissous dans de l'eau distillée (150 mL) puis précipité à nouveau par 500 mL d'éthanol. Le polysaccharide précipité est finalement extrait par une nouvelle centrifugation (10000 g, 15 minutes, 4 °C). Cette étape de dissolution du culot dans l'eau est de précipitation à l'éthanol est répétée 3 fois (un suivi conductimétrique est réalisé au cours du dessalage). Le culot final est lavé successivement par de l'éthanol (500 mL) puis de l'acétone (500 mL). Le polysaccharide est séché à 45 °C pendant 24 heures dans une étuve puis broyé dans un mortier en une fine poudre blanche (**GM**). Le protocole d'extraction des polysaccharides de graines est schématisé dans la **Figure 38**.

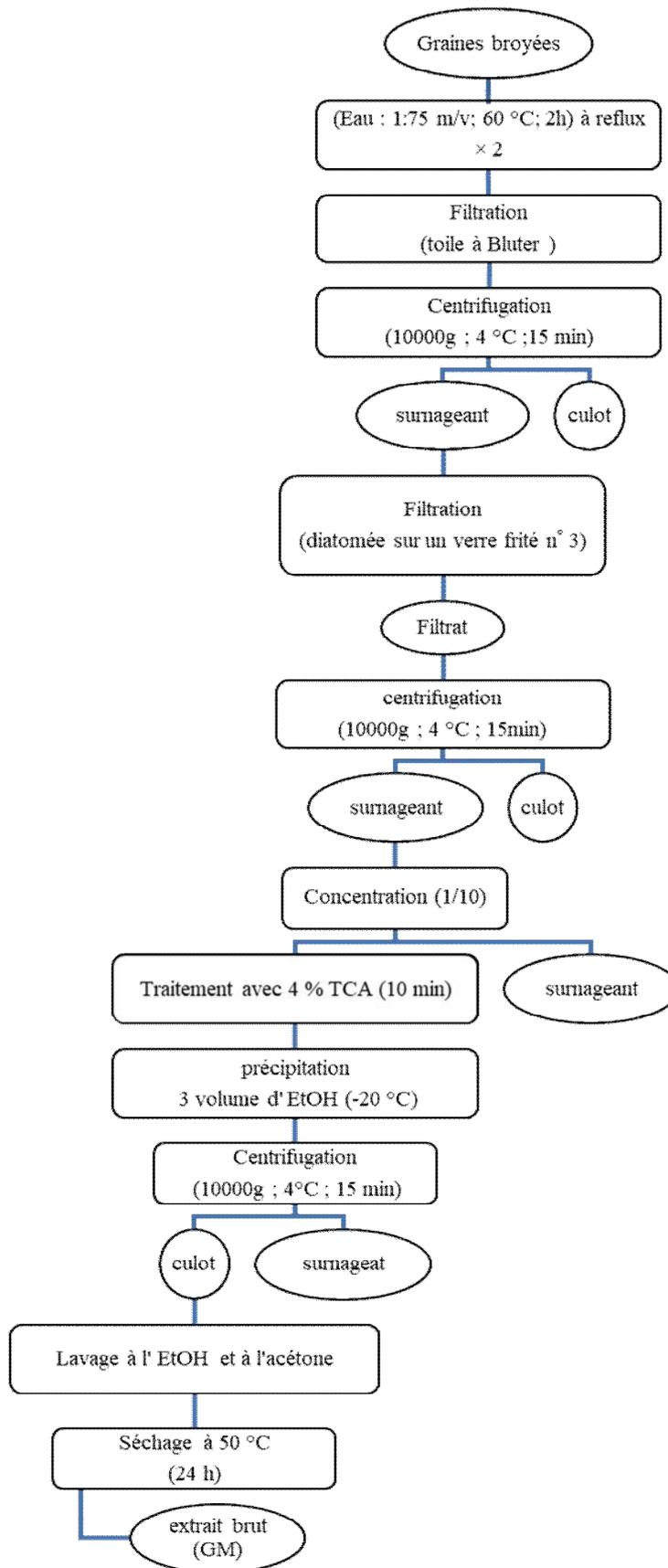


Figure 38: Extraction aqueuse des polysaccharides de graines d'*Astragalus gombo* Bunge.

### 2.3. Calcul du rendement d'extraction

Les rendements d'extraction des polysaccharides bruts sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{\text{masse du polysaccharide extrait (g)}}{\text{Masse de la poudre sèche de la plante (g)}} \times 100$$

### 2.4. Dosages colorimétriques

Les teneurs en oses acides (OA), oses neutres (ON), oses totaux (OT), sucres réducteurs, protéines et polyphénols des polysaccharides d'*Astragalus gombo* ont été déterminées par des méthodes colorimétriques.

#### 2.4.1. Dosage des oses

La quantification des oses constitutifs des polysaccharides s'effectue par des dosages colorimétriques. 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 des dérivés furfuriques et des dérivés d'acide 5-hydroxyméthylfurfural. Ces derniers peuvent réagir par condensation avec le phénol pour les OT (Dubois *et al.*, 1956) et les composés phénoliques tels que le résorcinol pour les ON (Monsigny *et al.*, 1988) et le méta-hydroxybiphényle (mHBP) pour les OA (Blumenkrantz et Asboe, 1973) pour donner des composés absorbant la lumière à des longueurs d'onde spécifiques.. Il s'agit de tests très sensibles qui permettent de détecter jusqu'à 1 µg de composé glucidique.

##### 2.4.1.1. Dosage des oses totaux par la méthode de Dubois

La teneur en oses totaux constitutifs des polysaccharides d'*A. gombo* est quantifiée par la méthode de Dubois *et al.* (1956) utilisant l'acide sulfurique et le phénol comme réactifs. Les liaisons glycosidiques sont hydrolysées, à chaud, en présence d'acide sulfurique concentré et la déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de composés furfuriques. Ces derniers interagissent avec le phénol par condensation pour former des composés de coloration orange-jaune absorbant à 485 nm.

Une gamme étalon de glucose est réalisée avec des concentrations comprises entre 0 et 0,25 g/L dans l'eau milli-Q. Une solution de phénol à 5 % (m/v) est préparée avec de l'eau milli-Q.

Le principe du dosage est le suivant :

- déposer dans les tubes de dosage 200 µL d'échantillon ;
- ajouter 200 µL de la solution de phénol ;
- ajouter 1 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 80 % ;

- vortexer les tubes (5 secondes) puis les incuber 5 minutes dans un bain marie sec à 90 °C ;
- laisser reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min ;
- mesurer l'absorbance à 485 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240A, Shimadzu).

### 2.4.1.2. Dosage des oses acides (OA) et des oses neutres (ON)

#### 2.4.1.2.1. Dosage des oses acides (OA)

La teneur en OA constitutifs des polysaccharides extraits d'*A. gombo* est quantifiée par la méthode de Blumenkrantz et Asboe (1973). Lors du dosage des oses acides (acides uroniques), les dérivés de furfural générés par l'hydrolyse des polysaccharides par l'acide sulfurique se condensent avec le méta-hydroxybiphényle (m-HBP) pour donner un complexe rose-violet dont l'absorbance est mesurée à 490 nm. Une gamme étalon d'acide galacturonique est réalisée avec des concentrations comprises entre 0 et 0,25 g/L dans l'eau milli-Q.

Une solution acide (Solution A) est préparée dans un bain de glace en dissolvant 4,576 g de tétraborate de sodium ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) dans 100 mL d'acide sulfurique à 95-97 %. Une solution de m-HBP (Solution B) est préparée dans un bain de glace en dissolvant 100 mg de mHBP dans 1 mL de DMSO. Les solutions A et B sont conservées à 4 °C à l'abri de la lumière. Avant le dosage, une solution C est préparée en mélangeant 100 µL de la solution B avec 4,9 mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 80 %. Cette solution C est maintenue à 4 °C à l'abri de la lumière.

Le principe du dosage est le suivant :

- déposer dans les tubes de dosage 200 µL d'échantillon ;
- ajouter 1 mL de la solution A ;
- incuber les tubes pendant 60 minutes dans un bain marie sec à 80 °C ;
- laisser reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 minutes ;
- ajouter 20 µL de solution C et vortexer 5 secondes ;
- laisser reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 minutes ;
- mesurer l'absorbance à 490 nm.

#### 2.4.1.2.2. Dosage des oses neutres (ON)

Lors du dosage des oses neutres, les dérivés de furfural générés par l'hydrolyse des polysaccharides par l'acide sulfurique se condensent avec le résorcinol pour donner un complexe brun-orange dont l'absorbance est mesurée à 450 nm.

Une solution de résorcinol est préparée à 6 mg/mL dans l'eau milli-Q et est stockée à 4 °C (stabilité de 4 semaines). Une gamme étalon de glucose est préparée de 0 à 0,25 g/L dans l'eau milli-Q.

Le principe du dosage est le suivant :

- déposer dans les tubes de dosage 200 µL d'échantillon ;
- ajouter 200 µL de la solution de résorcinol et 1 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 80 % ;
- vortexer les tubes (5 secondes) ;
- incuber les tubes 30 minutes dans un bain marie sec à 80 °C ;
- laisser reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min ;
- mesurer l'absorbance à 450 nm.

### 2.4.1.2.3. Détermination de la concentration en OA et ON

En raison de l'interférence des oses acides lors du dosage des oses neutres, il est nécessaire de corriger les calculs par une méthode mathématique décrite par Montreuil et Spik (1963).

L'analyse spectrophotométrique des solutions témoins d'oses neutres (glucose) et d'oses acides (acide galacturonique) permet de tracer les droites d'étalonnages du dosage. La pente de chaque droite étalon est ensuite mesurée :

#### Dosage au Résorcinol :

Pente =  $\alpha$  pour les oses neutres

Pente =  $\beta$  pour les acides uroniques

#### Dosage au m-HBP :

Pente =  $\alpha'$  pour les oses neutres

Pente =  $\beta'$  pour les acides uroniques

A partir de ces pentes et en fonction des absorbances mesurées lors des dosages, les concentrations en OA et ON sont déterminées grâce aux expressions suivantes :

$$[ON] = \frac{Abs_{mHBP} - \beta' [AU]}{\alpha'}$$

$$[OA] = \frac{Abs_{resorcinol} - (\alpha/\alpha') Abs_{mHBP}}{(\alpha' \beta - \alpha \beta') / \alpha'}$$

### 2.4.2. Dosage des sucres réducteurs

Le couple L-sérine/Cu<sup>2+</sup>, en présence d'une extrémité réductrice, est réduit en L-sérine/Cu<sup>+</sup>. Ce nouveau couple forme avec le 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline un complexe pourpre qui absorbe à 540 nm. L'absorbance à cette longueur d'onde est proportionnelle au taux de sucres réducteurs dans la solution (Waffenschmidt et Jaenicke, 1987).

## Chapitre 2 : matériels et méthodes

---

Une gamme étalon de glucose est préparée de 0 à 0,2 g/L dans l'eau milli-Q. On prépare deux solutions A et B qui sont ensuite mélangées volume à volume.

### **Solution A :**

2,42 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 6,35 g de  $\text{NaHCO}_3$  et 194,2 mg de 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline sont dissous qsp pour 100 mL d'eau milli-Q.

### **Solution B :**

126,2 mg de L-sérine et 124,8 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  sont dissous qsp 100 mL d'eau milli-Q.

Les 2 solutions sont stables 4 semaines à 4 °C à l'obscurité.

Le principe du dosage est le suivant :

- déposer dans les tubes de dosage 5 mL d'échantillon ;
- ajouter 250  $\mu\text{L}$  du mélange A/B fraîchement préparé ;
- incuber les tubes 15 minutes dans un bain marie sec à 100 °C ;
- laisser reposer dans un bain de glace pendant 30 min ;
- mesurer l'absorbance à 540 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240A, Shimadzu).

### **2.4.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

La méthode de Bradford (1976) est un dosage colorimétrique très sensible pour déterminer la concentration des protéines dans un échantillon. Elle repose sur la formation d'un complexe entre le bleu de Coomassie G-250 et les protéines en solution. Ce complexe est quantifiable au spectrophotomètre à 595 nm. Le bleu de Coomassie lie surtout aux résidus arginine, tryptophane, tyrosine, histidine, et phénylalanine des protéines.

Une gamme étalon de sérum albumine bovine (SAB) est préparée de 0 à 0,1 g/L dans l'eau milli-Q.

Le principe du dosage est le suivant :

- déposer dans les tubes de dosage 500  $\mu\text{L}$  d'échantillon ;
- ajouter 500  $\mu\text{L}$  de réactif de Bradford (BRADFORD REAGENT- B6916 de chez Sigma-Aldrich) ;
- vortexer les tubes (5 secondes) ;
- laisser reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min ;
- mesurer l'absorbance à 595 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240A, Shimadzu).

### 2.5. Caractérisation structurale des polysaccharides

#### 2.5.1. Détermination des monosaccharides constitutifs

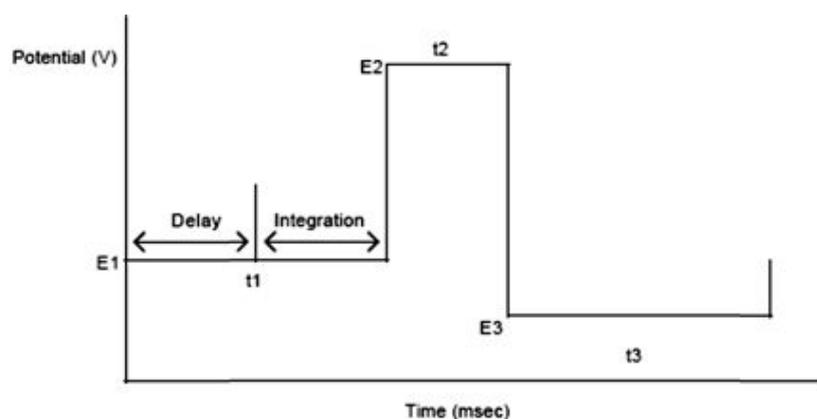
L'analyse des monosaccharides constitutifs des polysaccharides extraits d'*Astragalus gombo* est réalisée par deux méthodes décrites ci-dessous : la chromatographie ionique haute pression et la chromatographie en phase gaz

##### 2.5.1.1. Chromatographie ionique haute pression (HPAEC-PAD)

Les groupements hydroxyles des oses (-OH) peuvent s'ioniser en oxyanions ou alcoolates (-O<sup>-</sup>) à des pH supérieurs au pKa des monosaccharides. Sous cette forme ils peuvent être séparés selon leur affinité avec une phase stationnaire constituée d'ammoniums quaternaires qui jouent le rôle d'échangeurs d'anions. L'analyse par HPAEC couplée à la détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) est basée sur l'ionisation des monosaccharides en milieu fortement alcalin ce qui permet de les séparer sur une colonne échangeuse d'anions. Leur détection par ampérométrie pulsée est très sensible (de l'ordre d'une dizaine de picomoles)...

##### *Principe :*

Le principe consiste à mesurer le courant électrique généré par les molécules oxydées à la surface d'une électrode en or. Pour cela, une séquence de trois potentiels (**Figure 39**) est appliquée à l'électrode : tout d'abord le potentiel E1 permet de mesurer le courant dû à l'oxydation du sucre (**Figure 40**). Ensuite, ce potentiel est augmenté au niveau E2 de manière à oxyder la surface de l'électrode et éliminer le sucre. Il est ensuite abaissé au niveau E3 afin de réduire la surface de l'électrode.



**Figure 39: Diagramme des potentiels appliqués à l'électrode d'or d'un détecteur ampérométrique pour la détection des sucres ([www.dionex.com](http://www.dionex.com)).**

L'appareillage utilisé est une chaîne de chromatographie ionique ICS 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale (CA), USA) composée d'un module de pompe pouvant fonctionner en gradient et d'un détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC-PAD). La boucle d'injection fait 25 µL.

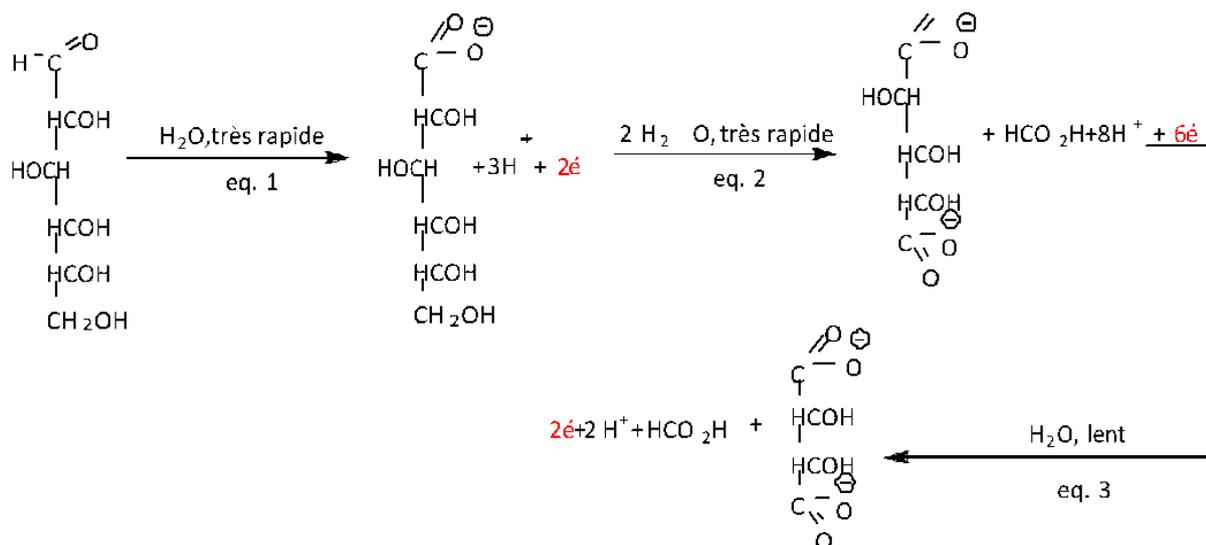


Figure 40: Exemple de l'oxydation du glucose sur une électrode d'or en ampérométrie pulsée.

**Mode opératoire :**

L'hydrolyse préalable est réalisée en dissolvant 5 mg de polysaccharide dans 1 mL d'acide trifluoroacétique (TFA) 2 M. Ce mélange est vortexé 5 secondes puis incubé dans un bain marie sec à 120 °C pendant 90 min. La solution est ensuite évaporée sous un courant d'azote. Les hydrolysats sont dissouts dans 1 mL d'eau Milli-Q puis filtrés sur 0,22 µm avant injection (25 µL). L'analyse des monosaccharides est réalisée en utilisant une pré-colonne CarboPac PA1 (Dionex 4 x 50 mm) et une colonne CarboPac PA1 (Dionex 4 x 250 mm). La phase stationnaire est constituée de billes de polystyrène et divinylbenzène de 10 µm de diamètre sur lesquelles sont agglomérées des particules fonctionnalisées par des groupements  $\text{NR}_4^+$ . Cette composition constitue une phase stationnaire très résistante permettant d'atteindre des pressions stables de 4 000 psi (275 bars) dans une gamme de pH de 0 à 14. Pour l'analyse des oses neutres, l'élution des échantillons est en mode isocratique par une solution de NaOH décarbonatée à 16 mM pendant 20 min à un débit de 0,5 mL/min. Après chaque élution, une chasse de 30 minutes avec une solution de NaOH à 100 mM est réalisée pour éluer les éventuels contaminants encore en interaction avec la phase stationnaire. Avant chaque analyse la colonne est équilibrée pendant 10 min avec la solution de NaOH 16 mM.

Les oses acides sont élués par un gradient binaire à 0,5 mL/min :

Eluant A : Solution d'hydroxyde de sodium à 100 mM ;

Eluant B : Solution d'acétate de sodium ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) 1 M dans l'éluant A (NaOH 100 mM).

Le programme d'analyse est : 100 % de A pendant 5 min, suivi d'un gradient linéaire de B dans A de 0 à 100 % pendant 60 min, puis 100 % de B maintenus pendant 10 min.

L'étalonnage est effectué avec des solutions de L-rhamnose, L-arabinose, D-glucose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, acide glucuronique et acide galacturonique. Les injections (échantillons et standards) sont réalisées en triplicata et l'acquisition des données et leur traitement sont réalisés par le logiciel Chromeleon (version 6.8).

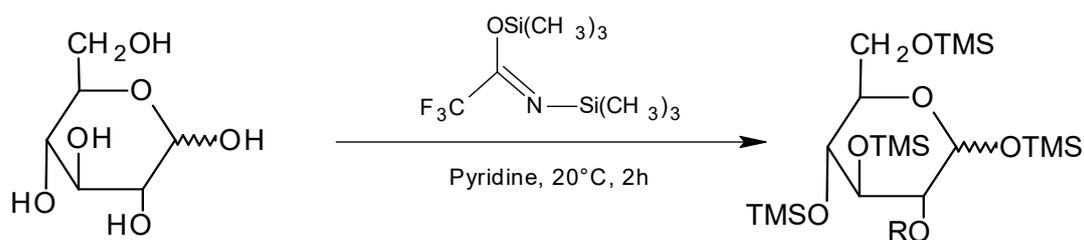
### 2.5.1.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG/SM-EI

L'analyse par CG/SM-EI de l'hydrolysate acide d'un polysaccharide permet de déterminer sa composition monosaccharidique après dérivatisation des monosaccharides formés. En effet, la CG/SM-EI ne permet pas d'analyser directement les mono- ou polysaccharides en raison de leurs groupements hydroxyles qui les rendent peu volatiles. Les groupements choisis pour dériver les sucres permettent de casser les liaisons hydrogènes et de masquer les dipôles, ce qui entraîne une volatilisation à des températures inférieures à 300 °C (température maximale de stabilité des phases standards). Les dérivatisations les plus fréquemment utilisées sont l'acétylation, la méthylation et la silylation. Les substituants utilisés (acétyles et triméthylsilyles) rendent non seulement le composé plus volatile, mais améliorent aussi l'ionisation du sucre par impact électronique (EI). L'ionisation par EI consiste en un impact d'électrons sur les molécules en sortie de chromatographie. Les hétéroatomes constituant les molécules sont le plus souvent atteints par ces électrons et forment des radicaux vrais et/ou des cation-radicaux. L'énergie des électrons envoyés sur les molécules à analyser est de 70 eV, ce qui permet la fragmentation des liaisons C-C. La fragmentation et l'abondance des fragments donnent à chaque composé un spectre de masse caractéristique correspondant à une empreinte. De ce fait, les spectres de masses en EI<sup>+</sup> présentent rarement le pic de l'ion moléculaire. Lorsque le sucre est dérivé, les groupements acétyle ou triméthylsilyle forment des zones de forte densité électronique, qui seront des cibles préférentielles pour les électrons issus de la source d'ionisation et induiront ainsi les fragmentations internes. L'identification de chaque monosaccharide se fait par comparaison de son temps de rétention relatif (par rapport à un étalon interne) avec ceux des monosaccharides purs authentique étudiés dans les mêmes conditions opératoires. De même, un coefficient de réponse est calculé pour chaque monosaccharide par rapport à l'étalon interne afin de définir la proportion de chacun au sein du polysaccharide. Il est à noter que chaque monosaccharide donnera plusieurs signaux

correspondant aux différentes formes anomériques des différentes conformations possibles pour chaque monosaccharide.

### **Principe :**

Les monosaccharides sont dérivatisés par triméthysilylation. Lors de la silylation, un hydrogène réactif est remplacé par un groupement alkyle-silyle, le plus souvent le triméthylsilyle (TMS). Le remplacement d'hydrogène par un groupement alkyle-silyle réduit la polarité du composé (Pierce, 1968). Les dérivés silyles (ex : dérivés de triméthyle) sont plus volatils, moins polaires et plus thermostables comparativement aux autres composés volatils générés (Kataoka, 2005). Le BSTFA (Bis (triméthysilyle) trifluoroacétamide) et le TMCS (triméthylchlorosilane) sont les réactifs les plus utilisés pour la triméthysilylation de plusieurs substances (alcools, alcaloïdes, amines, acides carboxyliques, phénols, etc.). L'agent de silylation (le BSTFA) agit comme donneur triméthylsilylique puissant alors que le TMCS joue le rôle d'un catalyseur et augmente la réactivité du BSTFA améliorant ainsi l'efficacité de la dérivatisation (Shareef *et al.*, 2004). La **Figure 41** présente la réaction de triméthysilylation.

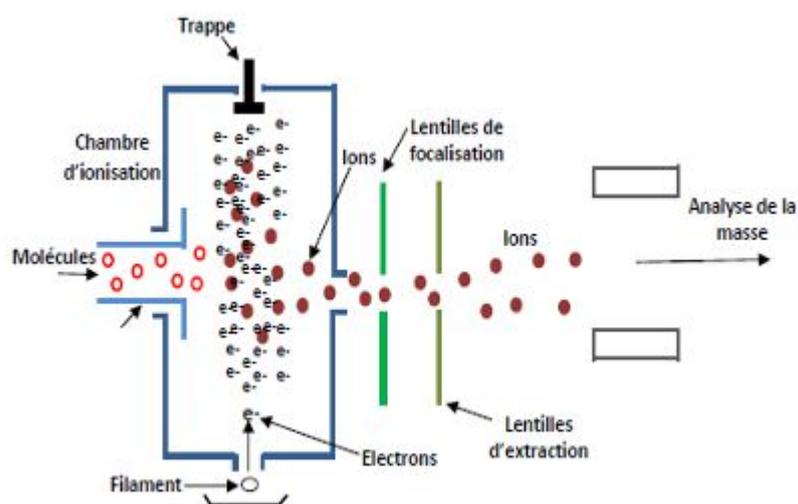


**Figure 41: Triméthysilylation des O-glycosides (Kamerling *et al.*, 2007).**

### **Mode opératoire :**

L'hydrolyse préalable est réalisée en dissolvant 5 mg de polysaccharide dans 1 mL d'acide trifluoroacétique (TFA) 2 M. Ce mélange est vortexé 5 secondes puis incubé dans un bain marie sec à 120 °C pendant 90 min. La solution est ensuite co-évaporée avec du méthanol sous un courant d'azote. En parallèle, un mélange (solution A) de N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA)/triméthylchlorosilane (TMCS) (99/1) est préparé pour la dérivatisation en adaptant les méthodes de Pierre *et al.* (2012, 2013). Brièvement, les monosaccharides obtenus sont triméthysilylés par ajout de 50 µL de pyridine et 50 µL de la solution A. Le mélange réactionnel est incubé 2 heures à température ambiante puis évaporé sous azote. Les résidus triméthylsilyl-O-glycosides sont solubilisés dans 500 µL de dichlorométhane avant analyse en chromatographie en phase gazeuse. Les échantillons sont analysés sur un chromatographe (Agilent 6890 Series GC System) couplé à un spectromètre

de masse (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector). Les solutions sont injectées dans une colonne de type 1 MS OPTIMA (de 30 m de longueur, de 0,32 mm de diamètre et dont l'épaisseur du film de la phase stationnaire est de 0,25  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel). Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium à un débit de 2,3 mL/min. La pression de l'hélium est de 8,8 psi. L'échantillon est injecté en mode split avec un ratio de 50:1. La montée en température est programmée pour une première étape à 100 °C pendant 3 min, une augmentation de 8 °C/min jusqu'à 200°C, puis un incrément final de 5 °C/min jusqu'à 250 °C. Le mode d'ionisation utilisé est l'impact électronique (EI, 70 eV), la température à la trappe est fixée à 150 °C et la plage de masse de 40-800 m/z. La **Figure 42** présente le schéma d'une source à ionisation par impact électronique.



**Figure 42:** Schéma d'une source à ionisation par impact électronique

### 2.5.2. Détermination des liaisons glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM-EI)

Une des étapes fondamentales à l'analyse et à la compréhension de la structure d'un polysaccharide passe par la détermination des liaisons glycosidiques reliant les monosaccharides entre eux. La position des liaisons glycosidiques constitutives du polysaccharide des graines d'*Astragalus gombo* a été déterminée par analyse CG/SM des monosaccharides après transformation en acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM) (**Figure 43**). La méthode la plus connue passe par la méthylation des groupements hydroxyles libres du polysaccharide suivie d'une hydrolyse acide et/ou enzymatique des liaisons glycosidiques (Peña *et al.*, 2012). Les monosaccharides sont ensuite réduits en alditols *via* l'utilisation de borohydrure de sodium (ou de borodeuteride de sodium pour marquer le groupement engagé dans le pont osidique) puis acétylés au niveau des groupements

hydroxyles libres (**Figure 43**). Les molécules générées portent le nom d'acétates d'alditols partiellement O-méthylés (**Figure 44**) et permettent d'accéder, après fragmentation par impact électronique, à des informations structurales comme la position des groupements O-méthyle et O-acétyle et donc des groupements hydroxyles engagés ou non dans une liaison glycosidique (Carpita et Shea, 1989).

### **Principe :**

#### **Préparation du réactif solide NaOH/DMSO :**

La méthylation de polysaccharides *via* l'utilisation de NaOH solide dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) est une méthode de méthylation souvent privilégiée par rapport à celles impliquant l'utilisation du BuLi (Butyllithium) dans du DMSO. La méthode qui a été utilisée dans ce travail est adaptée des travaux de Ciucanu et Kerek (1984).

Cent  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaOH à 50 (m/v) sont ajoutés à 200  $\mu\text{L}$  de méthanol anhydre dans un tube fermé. Après agitation forte (1 minute au vortex) et obtention d'une solution limpide, 1 mL de DMSO anhydre est ajouté. Le mélange est alors vortexé pendant 30 secondes puis centrifugé à température ambiante pendant 5 min à 3600 g. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est additionné à nouveau de 1 mL de DMSO, mélangé et centrifugé comme précédemment. Cette étape doit être répétée au moins deux fois, jusqu'à l'obtention d'un culot de NaOH opalescent (laiteux). Finalement, le culot est re-suspendu dans 200 à 300  $\mu\text{L}$  de DMSO anhydre et utilisé directement comme réactif pour l'étape de méthylation.

#### **Méthylation du polysaccharide :**

Pour cette réaction, 100 à 200  $\mu\text{g}$  de polysaccharide lyophilisé sont ajoutés à 200-500  $\mu\text{L}$  de DMSO anhydre dans un tube hermétique. Agiter doucement à 60 °C (100-150 rpm) pour solubiliser le polysaccharide. Deux cent  $\mu\text{L}$  du réactif solide NaOH/DMSO (cf. paragraphe ci-dessus) sont ajoutés à l'échantillon ainsi que 10  $\mu\text{L}$  d'eau Milli-Q afin de limiter les dégradations oxydatives (Ciucanu et Costello, 2003). Le mélange est ensuite conservé après agitation pendant 15 min à température ambiante. Trois cent  $\mu\text{L}$  d'iodométhane ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) sont ensuite ajoutés au mélange qui est conservé pendant 15 min à température ambiante puis refroidit dans un bain de glace pendant 15 minutes. Un mL d'eau Milli-Q est alors ajouté puis le mélange est vortexé pendant 30 secondes. L'excès d'iodométhane est éliminé sous un jet d'azote puis 1 mL de chloroforme est ajouté. Après mélange (vortex pendant 30 secondes) et centrifugation à température ambiante pendant 5 min à 3000 g, la phase inférieure organique est collectée et transférée dans un nouveau tube. Cette phase organique est ensuite lavée trois fois avec de l'eau Milli-Q puis le chloroforme est évaporé sous jet d'azote. Les résidus

## Chapitre 2 : matériels et méthodes

méthylés sont finalement repris dans un volume de méthanol. Les échantillons peuvent être stockés, si nécessaire, à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Formation des AAPM :

Les échantillons méthylés et stockés dans du méthanol sont traités par un jet d'azote pour éliminer le méthanol. Un mL d'acide trifluoroacétique (TFA, 2 M) est ajouté à 200-500  $\mu\text{g}$  de polysaccharides méthylés et 50  $\mu\text{L}$  de myo-inositol à 20 mM sont additionnés à l'échantillon. Des standards sont réalisés en parallèle avec des monosaccharides commerciaux (L-Rha, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GalA, D-GlcA) préparés à partir de solutions à 20 mM lyophilisées.

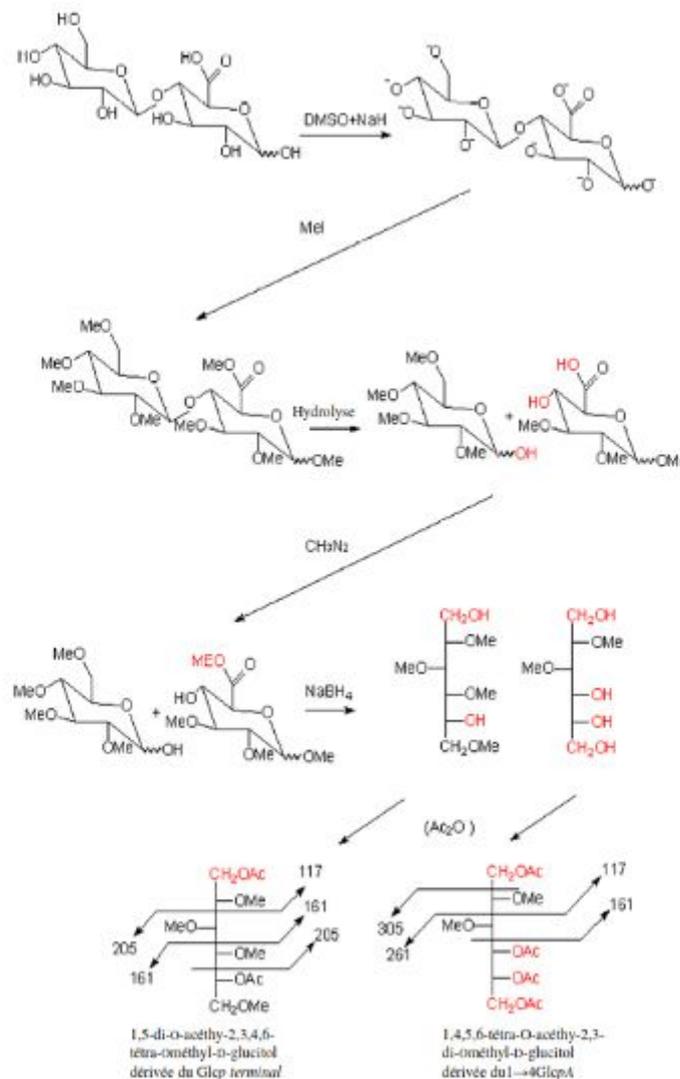
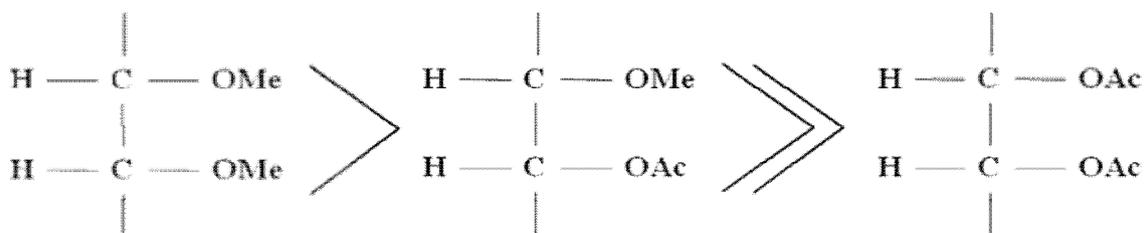


Figure 43: Formation des AAPM (Garon-Lardière, 2004).



**Figure 44: Ordre de clivage préférentiel au sein des AAPM (Garon-Lardière, 2004).**

Les échantillons (polysaccharides et monosaccharides standards) sont ensuite chauffés pendant 90 min à 120 °C dans un bain marie à sec, puis refroidis dans un bain de glace jusqu'à atteindre la température ambiante. Le TFA est finalement évaporé sous jet d'azote. Les traces résiduelles de TFA sont éliminées par addition de 1 mL de méthanol qui est ensuite également éliminé sous jet d'azote (bien vortexer au moins 30 secondes les tubes pour dissoudre les produits dans le méthanol). Cette étape peut être renouvelée si nécessaire puisque le pH requis pour l'étape suivante doit être alcalin afin d'assurer une bonne réduction des monosaccharides. A cette étape, les échantillons peuvent être congelés à -20 °C.

Une solution de borohydrure de sodium ou de borodeuteride de sodium (pour marquer les groupements engagés dans liaisons osidiques) à 100 mg/mL dans une solution d'hydroxyde d'ammonium à 1 M est diluée avec 5 volumes de DMSO. Six cent  $\mu\text{L}$  de cette solution diluée sont ajoutés à l'échantillon et la solution est incubée 90 min à 45 °C dans un bain marie sec. Il est important de vortexer les tubes au moins 30 secondes toutes les 30 minutes. Ensuite, 100  $\mu\text{L}$  d'acide acétique glacial sont ajoutés pour éliminer le  $\text{NaBH}_4$  (ou  $\text{NaBD}_4$ ) en excès sous forte agitation (vortex pendant 1 minute). Le mélange est alors additionné de 100  $\mu\text{L}$  de 1-méthylimidazole et de 75  $\mu\text{L}$  d'anhydride acétique. Après mélange pendant 30 secondes minimum au vortex, la solution est incubée pendant 30 min à 40-45 °C dans un bain marie sec avant ajout de 2 mL d'eau Milli-Q puis agitée au vortex pendant au moins 1 minute. Le mélange est alors refroidi puis 1 mL de dichlorométhane sont ajoutés et le milieu est agité pendant 1 minute au vortex. La solution est ensuite centrifugée à température ambiante pendant 5 min à 3000 g puis la phase supérieure est éliminée. Cette étape est répétée 5 fois afin d'éliminer les traces résiduelles de sels et de DMSO. Pour finir, la phase organique est évaporée sous jet d'azote et les AAPM formés sont repris dans 100 à 200  $\mu\text{L}$  de dichlorométhane. Les AAPM sont analysés par CG-SM-EI sur une colonne OPTIMA-1MS (30 m, 0,32 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ) avec un débit d'hélium de 2,3 mL/min. La pression d'hélium est fixée à 8,8 psi et le split ratio de 1 : 1 à 50 : 1 en fonction de la concentration de l'échantillon. La température initiale du four à 80 °C est maintenue pendant 2 min puis une première montée en température de 30 °C/min jusqu'à 170 °C est programmée. Elle est suivie d'un

gradient jusqu'à 240°C à 4 °C/min. la température est ensuite maintenue pendant 20 min. L'ionisation est réalisée par Impact Electronique (EI, 70 eV), la température de la trappe est fixée à 150 °C et le target ion à 40-800 m/z. La température de l'injecteur est fixée à 250 °C.

### 2.5.3. Analyses spectroscopiques

#### 2.5.3.1. Analyses par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et qui nécessite peu d'échantillon. Certains groupements, considérés comme marqueurs, peuvent révéler la présence de certaines catégories de polysaccharides ou d'autres molécules associées (composés phénoliques, protéines). Les profils des spectres IR ainsi que les intensités relatives des bandes d'absorption obtenues lors de l'analyse des polysaccharides de même structure sont similaires.

##### *Principe :*

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou **FTIR** : Fourier Transformed Infrared Spectroscopy) se base sur l'interaction qu'il existe entre un rayonnement de type infrarouge (IR) et la molécule à analyser. La spectroscopie infrarouge permet donc de déterminer l'empreinte digitale chimique polysaccharides. Un spectre IR se caractérise par le tracé de l'absorbance d'un photon en fonction de son nombre d'onde ( $1/\nu$ ). Le nombre d'onde qui est l'unité la plus couramment utilisée en spectroscopie IR est directement proportionnel à la fréquence et donc à l'énergie du rayonnement absorbé par la molécule analysée. Ainsi, le principe de la spectroscopie IR consiste à sonder la molécule au moyen d'un rayonnement IR situé dans la gamme  $4000\text{ cm}^{-1}$  et  $400\text{ cm}^{-1}$  et à analyser l'absorption du rayonnement émis par la molécule vibrant sous l'action du IR. Une molécule, selon ses degrés de liberté et de l'onde IR excitatrice peut absorber une quantité d'énergie pour la transformer en mouvement. Il existe donc, pour une molécule donnée, plusieurs modes de vibrations correspondant à des fréquences caractéristiques données. Ces vibrations sont classées selon deux catégories : Les vibrations dites de déformations (bending) et les vibrations dites d'élongation (Stretching).

##### *Mode opératoire :*

Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de type VERTEX 70 FT-IR. Les extraits secs des tiges et des graines d'*Astragalus gombo* sont déposés sur un ATR A225 diamant. Les spectres IR (60 scans) ont été enregistrés à température ambiante avec une gamme de nombre d'onde allant de  $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ . Les spectres ont été analysés avec le logiciel OPUS 7.2.

### 2.5.3.2. Analyses par spectroscopie de Résonance Magnétique et Nucléaire (RMN)

La RMN est une technique non destructrice d'une grande importance dans l'élucidation de la structure et de la stéréochimie des polysaccharides. Elle permet en effet, de réaliser l'identification fine de chacun des monosaccharides constitutifs d'un polysaccharide, d'en préciser l'enchaînement, les points de branchement et les anoméries.

#### *Principe :*

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique reposant sur les propriétés magnétiques du noyau. Elle est fondée sur la mesure de l'absorption d'une radiation dans le domaine des fréquences radio par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. La RMN est directement liée aux spins des noyaux (propriété du spin nucléaire), c'est-à-dire, à des moments magnétiques associés aux noyaux actifs comme le  $^1\text{H}$  (proton) et le  $^{13}\text{C}$  (carbone). Ils se comportent comme des entités magnétiques élémentaires et peuvent interagir avec d'autres champs magnétiques. Les spins d'atomes de molécules peuvent s'aligner parallèlement ou antiparallèlement à un champ magnétique, conduisant à des niveaux d'énergie différents. Les transitions entre les niveaux d'énergie peuvent être stimulées et l'absorption d'énergie peut être enregistrée comme un signal de résonance. Il existe 3 grands types d'interaction entre les spins et le champ magnétique ; l'une des principales étant l'interaction spins/champ magnétique. Elle est quantifiée par le déplacement chimique ( $\delta$ ppm). Les spectres contiennent des informations sur l'environnement chimique des atomes (déplacement chimique), la géométrie moléculaire (couplage spin-spin) et le nombre d'atomes donne lieu à l'intensité du signal (intégrale).

L'échantillon est dissout dans un solvant dépourvu d'hydrogène afin de ne pas masquer les protons de l'échantillon à analyser. La position des différentes raies du spectre RMN est déterminée par rapport à une référence. Dans le cas du proton, on utilise le tétraméthylsilane (TMS). L'échelle de notation utilisée est le déplacement chimique noté  $\delta_i$ , exprimé en parties par million :

$$\delta_{ppm} = \frac{\nu_i - \nu_{ref}}{\nu_0} \times 10^6$$

Avec :  $\nu_i$  : Fréquence de résonance du noyau  $i$ ,  $\nu_{ref}$  : fréquence de résonance de la référence (TMS) et  $\nu_0$  : fréquence du champ statique.

Le déplacement chimique d'un proton dépend essentiellement de la nature de l'atome qui le porte, des substituants portés par cet atome ainsi que de la nature des atomes adjacents et des substituants portés par ces derniers. Les déplacements chimiques donnent donc des indications sur l'environnement chimique du groupe auquel appartient le proton considéré.

Il est ainsi possible d'identifier des groupes de protons à partir de la valeur de  $\delta$ ppm. Dans un spectre RMN, l'intensité d'un signal est mesurée par sa surface. L'intégration des surfaces des signaux se présente sous la forme d'une série de paliers. La hauteur de chaque palier est proportionnelle au nombre de  $^1\text{H}$  correspondants.

### ***Mode opératoire :***

Le polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo* (GM) est pré-hydrolysé à l'acide afin d'augmenter sa solubilisation pour favoriser l'analyse RMN. Pour cela, GM (1 g) est hydrolysé dans 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (20 % v/v) pendant 30 minutes à 50 °C sous agitation (500 rpm). L'hydrolysate est ensuite refroidi à 4 °C dans un bain de glace puis neutralisé par ajout d'une solution de NaOH (10 M). La solution est ensuite dialysée contre de l'eau Milli-Q pendant 72 heures en utilisant un boudin de dialyse (seuil de coupure de 3,5 kDa). Finalement, le dialysat est lyophilisé pour donner 0,3 g d'un GM de faible masse moléculaire nommé GMHD.

Pour l'analyse RMN, 50 mg de GMHD sont dissout dans 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9 % D) puis lyophilisés. Cette étape est répétée 3 fois afin d'échanger les hydrogènes des groupes hydroxyles par du deutérium dans le but de faciliter l'analyse RMN. Finalement GMHD est solubilisé dans du  $\text{D}_2\text{O}$  (100 g/L) avant analyse. Les analyses RMN ont été réalisées à 60 °C sur un appareil de type Brüker Avance III 600 équipé d'une sonde double  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ . Les expériences RMN ont été enregistrées avec une largeur spectrale de 3000 Hz, un temps d'acquisition de 1,36 s, un nombre de 256 balayages, un temps de relaxation de 1 s et une largeur d'impulsion de 7 s. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Les programmes de séquences impulsionsnelles standards fournies par Brüker ont permis de réaliser les expériences proton, carbone, DEPT et bidimensionnelles COSY, NOESY, HSQC et HMBC nécessaires pour caractériser la structure du polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo*.

## **2.6. Caractérisation physico-chimique des polysaccharides**

### **2.6.1. Détermination de la masse moléculaire par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière (SEC/MALLS)**

La détermination de la masse moléculaire des polysaccharides a été réalisée en chromatographie d'exclusion stérique (CES) couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multiangles (SEC MALLS : Size Exclusion Chromatography-Multi-Angle Laser Light Scattering) et d'un réfractomètre différentiel.

### **Principe :**

Cette technique consiste à séparer les macromolécules par CES et à déterminer leur masse moléculaire par un détecteur à diffusion de lumière multi-angles et un réfractomètre différentiel positionnés en sortie de colonne. Les macromolécules vont diffuser la lumière d'une source laser. Cette diffusion est variable selon la conformation de la macromolécule. Des photodiodes placées à des angles caractéristiques recueillent le signal qui permet d'accéder à la masse moléculaire de la molécule analysée. Le logiciel Astra donne les variations de l'intensité de la lumière diffusée au niveau de chaque photorécepteur.

La SEC MALLS est généralement composée de 3 détecteurs montés en série :

Un appareil de diffusion de la lumière laser He-Ne ( $\lambda = 690 \text{ nm}$ ), permet d'accéder à la masse moléculaire et au rayon de giration  $R_G$  à partir de la méthode de Zimm (1948) dont la relation est présentée ci-dessous, qui représente l'évolution de  $Kc/R(\theta)$  en fonction de  $\sin^2(\theta/2)$  ;

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{Mw} + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} + \frac{Rg^2}{Mw} + \sin^2 \frac{\theta}{2} + 2 A_2 c + 3 A_3 c^2 + \dots$$

$$\text{Ou } k = \frac{2\pi^2}{\lambda_0^4 N_a} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2$$

$\Delta R_0$  : Rapport de Rayleigh ;

$C$  : Concentration de polymère (g/mL) ;

$Mw$  : Masse moléculaire moyenne en poids du polymère

$Rg$  : Rayon de giration (nm) ;

$n_0$  Indice de réfraction du solvant ;

$\lambda_0$  : Longueur d'onde du faisceau incident (nm) ;  $N_a$  : Nombre d'Avogadro ;

$dn/dc$  : Incrément d'indice de réfraction ;

$\theta$  : Angle d'observation par rapport à la lumière incidente ;

$A_2$  : Second coefficient du viriel.

Un réfractomètre différentiel qui permet de déterminer la concentration de chaque fraction par le biais d'un indice de réfraction différentiel (DRI) ;

Un viscosimètre capillaire (Viscostar II, Wyatt Technology Corp., États-Unis) qui permet d'accéder à la viscosité relative de chaque fraction.

La détermination de la concentration en polymère par réfractométrie, permet d'estimer la masse moléculaire moyenne en poids ( $Mw$ ), la masse moléculaire moyenne en nombre ( $Mn$ ), la viscosité intrinsèque  $[\eta]$ , le rayon de gyration ( $Rg$ ), le rayon hydrodynamique ( $Rh$ ) et l'indice de polydispersité ( $Ip = Mw/Mn$ ) du polysaccharide extrait de la graine *Astragalus*

*gombo* en utilisant un  $dn/dc$  de 0,15 mL/g. La technique consiste à fractionner l'échantillon, selon le volume hydrodynamique des polymères, puis à analyser les fractions à l'aide des différents détecteurs.

La viscosité intrinsèque d'un polymère notée  $[\eta]$  représente la perturbation de l'écoulement de la solution due à une seule macromolécule isolée. C'est une grandeur microscopique. On définit  $[\eta]$  de la façon suivante :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{réd} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{C\eta_0}$$

$$\eta_{réd} = \frac{\eta_{sp}}{C} = \frac{\eta - \eta_0}{C\eta_0}$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$$

Avec :

$\eta_0$ : Viscosité absolue du solvant pur (Pa.s), dans notre cas, la viscosité de l'eau ( $10^{-3}$  Pa.s) ;

$\eta_r$  : Viscosité relative (Pa.s) ;

$\eta_{sp}$ : Viscosité spécifique (Pa.s) ;

$\eta$ : Viscosité réduite (Pa.s) ;

$\eta_{réd}$  : Viscosité intrinsèque (mL/g).

La viscosité intrinsèque est obtenue par extrapolation à concentration nulle de la viscosité réduite. Elle rend compte du volume hydrodynamique occupé par une macromolécule dans le solvant considéré. Elle est exprimée en mL/g.

Cette variation linéaire  $\eta_{sp}/C=f(C)$  est obtenue à partir de l'équation de Huggins :

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + k' [\eta]^2 C + \dots$$

Avec :  $k'$  = constante de Huggins.

Sur la représentation de Huggins ( $\eta_{sp}/C = f(C)$ ), la viscosité intrinsèque est obtenue en prenant la valeur de l'ordonnée à l'origine. La pente est représentative du paramètre d'Huggins ( $k'$ ). Par ailleurs, la viscosité intrinsèque est directement proportionnelle au volume hydrodynamique des macromolécules en solution. La constante de Huggins traduit les interactions polymère-polymère.

### **Mode opératoire :**

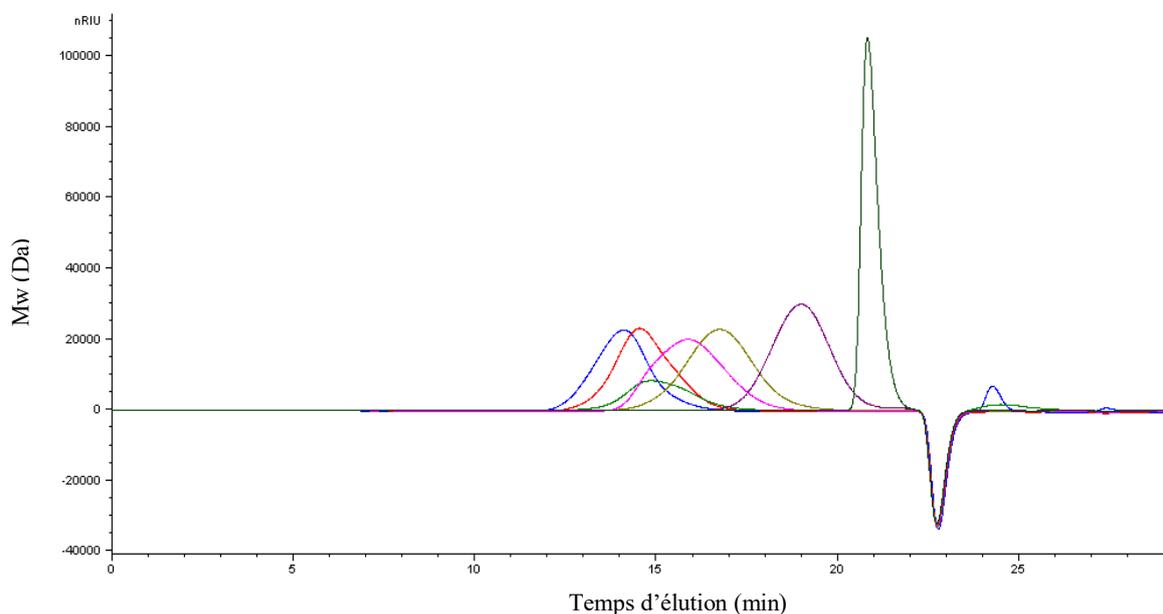
Les solutions sont éluées au travers une précolonne OHPAK SB-G (6 mm x 50 mm) et deux colonnes Shodex OHPAK SB806 HQ et SB804 HQ (phase stationnaire ; gel de polyhydroxyméthyleméthacrylate, dimensions : 8 mm x 300 mm) montées en séries au sein d'une chaîne chromatographique de type Waters Alliance GPC/V 2000 System. Les colonnes ont été éluées avec une solution de NaNO<sub>3</sub> 0,1 M à 0,7 mL/min. Le dispositif expérimental comprend un réservoir de solvant, une pompe (Shimadzu LC-20AD), un préfiltre d'une porosité de 0,1 µm destiné au solvant, d'un injecteur automatique (SIL-20A Shimadzu, Japon), un détecteur de diffusion de lumière multiangles : MALS (Dawn HELEOS II, Wyatt Technology Corp., Ca, USA), équipé d'une cellule K5 de 50 µL et de 18 diodes de mesure, un viscosimètre (viscostar II, Wyatt Technology Corp., Ca, USA) et un détecteur réfractométrique différentiel (DRI) : RID 10A Shimadzu, Japon.

Le GM est solubilisé à 0,2 g/L dans une solution de NaNO<sub>3</sub> (0,1 M) pendant 24 h sous agitation (250 rpm) à température ambiante puis la solution est filtrée à travers un filtre de 0,45 µm avant injection dans une boucle pleine de 100 µL. Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel Astra 4.50.

### **2.6.2. Détermination de la masse moléculaire par chromatographie d'exclusion stérique**

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) permet de séparer des macromolécules présentes dans une solution en fonction de leur volume hydrodynamique, et donc de leur masse molaire. Cette technique est utilisée afin de contrôler l'évolution des distributions de masses molaires lors de l'hydrolyse acide des polysaccharides extraits des graines d'*Astragalus gombo* (cf. Paragraphe 2.6.3.2. Analyses par spectroscopie de Résonance Magnétique et Nucléaire (RMN)). Une chaîne de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) Agilent 1100 Series a été utilisée. L'appareil dispose d'une cellule RID (Refractive Index Detector) permettant de détecter les substances ayant peu ou pas d'absorption dans les UV (notamment les polysaccharides) grâce à la variation d'indice de réfraction par rapport au tampon. La séparation s'est effectuée sur deux colonnes : TSK G5000PW<sub>XL</sub> (10 µm, 7,8 x 300 mm) et TSK G3000PW<sub>XL</sub> (10 µm, 7,8 x 300 mm) (Tosoh Bioscience) couplées en série. Ces deux colonnes sont précédées d'une pré-colonne de protection TSKgel PWXL (12 µm, 6,0 x 40 mm). Une élution thermostatée à 30 °C est réalisée en mode isocratique par une solution de NaNO<sub>3</sub> (0,1 M) à 1 mL/min. Une gamme de standards de dextranses (Sigma-Aldrich) de différentes masses moléculaires et de raffinose (Sigma-Aldrich) a été utilisée : de 500 kDa à 594,5 Da (**Tableau 8**). Les standards ont été

dissous à 10 g/L dans de l'eau Milli-Q puis filtrés sur 0,45 µm (Sartorius Ministart RC4) avant d'être injectés (20 µL). La **Figure 45** présente le profil d'élution des standards de dextranses et raffinose.



**Figure 45: Profil d'élution des standards de dextranses (Mw) : 500000 Da (bleu) ; 200000 Da (rouge) ; 150000 Da (vert foncée) ; 70000 Da (rose) ; 40000 Da (jaune) ; 6000 Da (mauve) et de raffinose (Mw) : 504,5 Da (vert-clair)**

Les masses moléculaires et les temps d'élution des standards utilisés sont donnés dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8: Masses moléculaires et temps d'élution des standards.**

Standard	10 g/L (MW Da)	$t_e$ (min)
Dextrane	500000	14,098
	200000	14,535
	150000	14,851
	70000	15,87
	40000	16,745
	6000	18,987
raffinose	504,5	20,815

La courbe d'étalonnage (**Figure 46**) est établie par la régression linéaire entre le  $\log(MP)$  et le temps d'élution. Ce qui nous donne la relation suivante, permettant d'estimer une masse moléculaire pour un temps d'élution donné :

$$M_p = 10^{-5,997 t_e + 21,438}$$

Avec :

$M_p$  : la masse molaire au sommet du pic d'élution (en g/mol)

$t_e$  : le temps d'élution (en min)

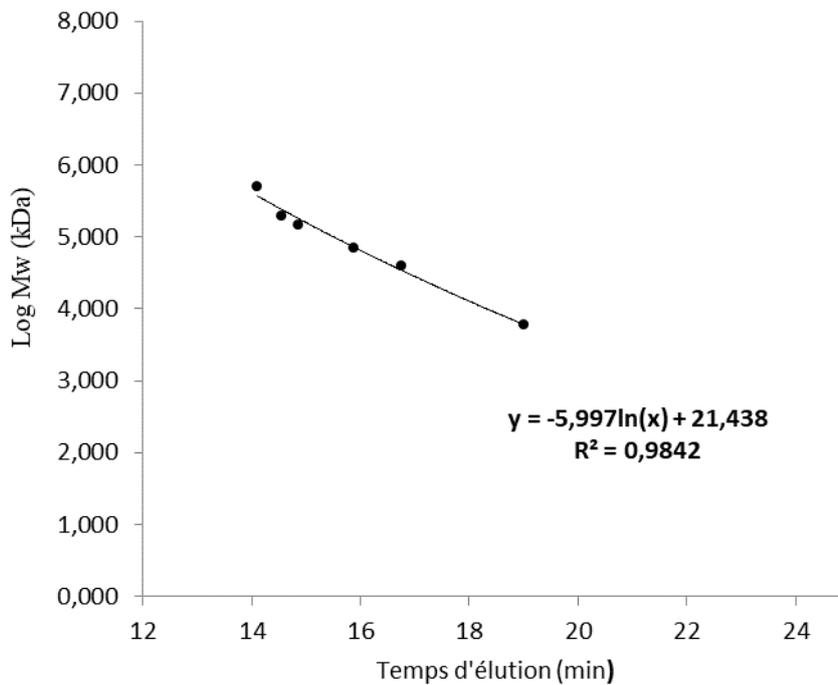


Figure 46: Courbe d'étalonnage obtenue à partir de différents standards

### 2.6.3. Etude rhéologique des polysaccharides d'*Astragalus gombo*

#### 2.6.3.1. La rhéologie

La rhéologie est une branche de la physique qui étudie l'écoulement ou la déformation des corps sous l'effet des contraintes qui leur sont appliquées, compte-tenu de la vitesse d'application de ces contraintes ou plus généralement de leur variation au cours du temps. La viscosité est la grandeur la plus couramment utilisée pour décrire le comportement d'un fluide. C'est une propriété intrinsèque du matériau. Le fluide est placé entre deux plans parallèles d'aire  $S$ . Une force tangentielle  $\vec{F}$  est exercée sur le plan supérieur.

La force appliquée par unité de surface d'un fluide correspond à la contrainte de cisaillement  $\sigma$  (Pa ou  $N.m^{-2}$ ), grandeur définie en tout point du matériau. Elle est représentée par l'équation :

$$\sigma = \frac{F}{S} = \eta \frac{dv}{dz} = \eta \dot{\gamma}$$

Avec :

$\dot{\gamma}$  : vitesse de cisaillement "shear rate" ( $s^{-1}$ ) ;

$\eta$  : viscosité dynamique (Pa.s) ;

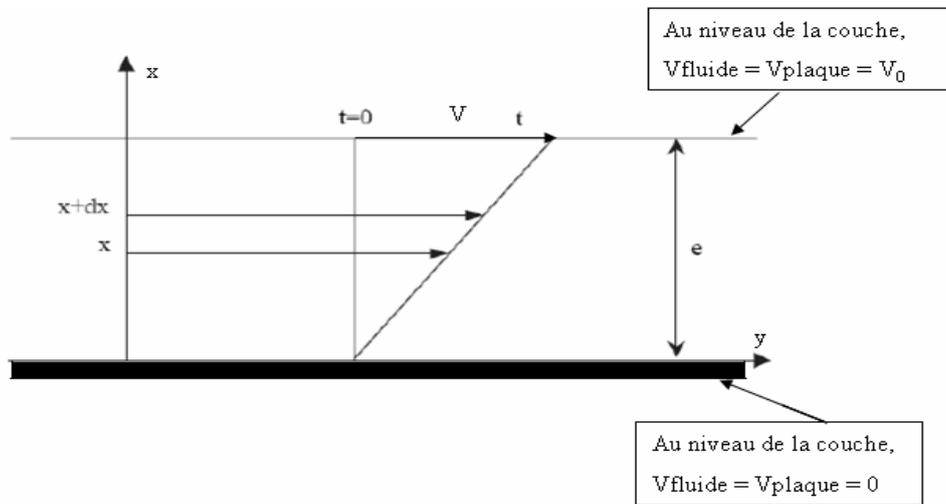
$F$  : force de frottement visqueux qui s'exerce à la surface de séparation de deux couches qui s'opposent au glissement d'une couche sur l'autre (N) ;

$S$  : surface en contact avec le fluide ( $m^2$ ) ;

$dv$  : différence de vitesse entre les deux couches ( $m.s^{-1}$ ) ;

$dz$  : distance séparant les deux couches de fluides contiguës (m).

Dans un écoulement de cisaillement simple, le fluide est placé entre deux plans parallèles distants de "e", dont l'un est en translation par rapport à l'autre (**Figure 47**).



**Figure 47: Schéma du principe de l'écoulement de cisaillement simple.**

Pour schématiser l'écoulement, on pose les hypothèses suivantes :

L'écoulement est laminaire et les couches de fluide glissent les unes sur les autres. Le matériau est assimilé à une superposition de couches adjacentes, d'une très faible épaisseur.

Considérons un élément de volume infinitésimal situé à l'instant  $t=0$  à une distance  $x$  du plan fixe. A un instant  $t$ , cet élément de volume aura parcouru la distance  $u(x, t)$ . On définit  $V$  la vitesse (m/s) :

$$V = \frac{du}{dt}$$

La vitesse de cisaillement  $\dot{\gamma}$  ( $S^{-1}$ ) définie par la relation suivante :

$$\dot{\gamma} = \frac{dV}{dx}$$

Cette vitesse dépend de la vitesse de déplacement du plan mobile et de l'épaisseur "e " cisailée. Si e est faible, il est possible d'atteindre des vitesses de cisaillement élevées, même avec  $V$  faible.

La façon dont la contrainte de cisaillement  $\tau$ , varie en fonction de la vitesse de déformation  $\dot{\gamma}$ , dépend de la viscosité. La viscosité peut être définie comme la résistance à l'écoulement uniforme et sans turbulence se produisant dans la masse d'une matière. La viscosité dynamique correspond à la contrainte de cisaillement qui accompagne l'existence d'un gradient de vitesse d'écoulement dans la matière. Lorsque la viscosité augmente, la capacité

du fluide à s'écouler diminue. L'unité de viscosité est le Pa.s. La grandeur caractéristique de l'écoulement est la viscosité dynamique ou viscosité apparent :  $\eta$  (en Pa.s).

La viscosité dynamique (ou viscosité apparente) peut être exprimée selon l'équation :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Avec :

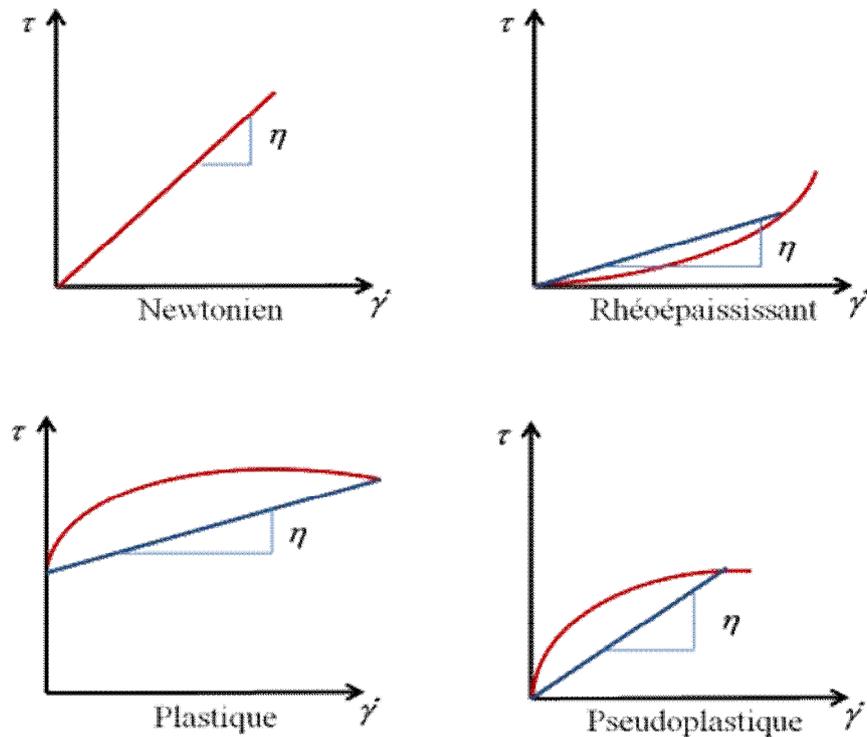
$\eta$  : C'est la viscosité dynamique (Pa.s) ;

$\tau$  : C'est la contrainte de cisaillement (Pa) ;

$\dot{\gamma}$  : C'est le taux de cisaillement "shear rate" ( $s^{-1}$ ).

Alors que la viscosité apparente d'un fluide ne dépend que de  $\sigma$  et  $\dot{\gamma}$ , on parle de viscosité apparente d'un liquide lorsque  $\eta$  varie avec le taux de cisaillement auquel il est soumis. La manière dont la viscosité apparente change va permettre de définir le comportement rhéologique du liquide (**Figure 48**).

Les expériences en écoulement fournissent des informations difficilement interprétables théoriquement au regard de l'évolution de la structure microscopique. Cependant les caractéristiques déterminées sous écoulement sont d'un intérêt pratique incontestable car elles renseignent sur l'aptitude d'un type de solution à satisfaire un type d'application donnée. L'objet de la rhéologie est de déterminer les contraintes et les déformations en chaque point d'un milieu (Persoz 1969). Son domaine d'application couvre l'ensemble des fluides complexes, tels que les polymères (polysaccharides), les suspensions colloïdales (protéines), les émulsions et les tensioactifs. Il est nécessaire de connaître le comportement de ces matières pour leur mise en œuvre. L'objectif principal de cette étude rhéologique est de caractériser les propriétés rhéologiques des solutions de galactomannane extrait des graines d'*Astragalus gombo*, et d'apporter des explications quant aux effets de plusieurs paramètres externes tels que la température et la concentration et d'en déduire des hypothèses de structuration.



**Figure 48: Comportements rhéologiques de liquides aux propriétés physiques différentes.**

Les rhéogrammes sont les représentations graphiques permettant de traduire le comportement mécanique des fluides sous l'effet des cisaillements. En effet, l'évolution de la viscosité apparente avec le gradient de cisaillement peut être représentée par des comportements types qui permettent de distinguer 4 catégories de fluide.

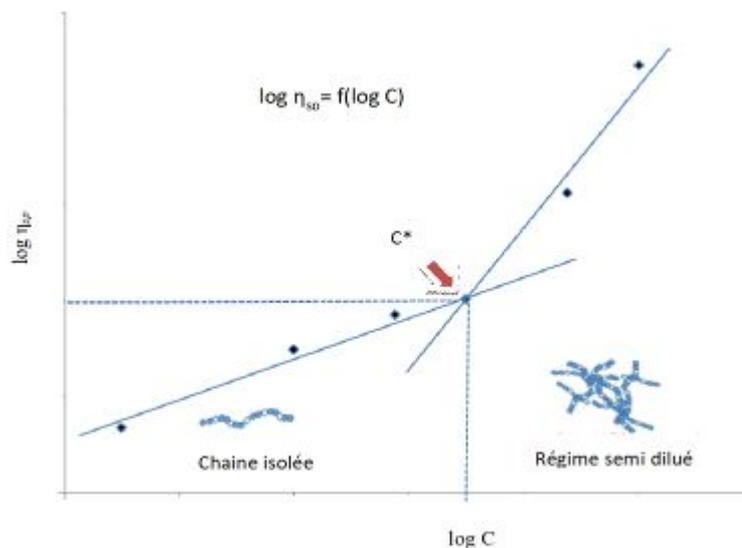
- **Les fluides newtoniens :**

Un fluide est dit Newtonien si sa viscosité dynamique  $\eta$  est indépendante de la contrainte appliquée (ou de la vitesse de cisaillement) et de la durée du cisaillement. Quand le fluide est non-Newtonien, la viscosité n'est plus indépendante de la vitesse de cisaillement, ou de sa contrainte ;

- **Les fluides plastiques ou fluides à seuil :** le seuil représente la limite d'énergie qu'il faut franchir afin que l'écoulement ait lieu ;
- **Les fluides pseudoplastiques ou rhéofluidifiants :** ces fluides présentent une diminution de la viscosité avec l'augmentation du taux de cisaillement ;
- **Les fluides rhéoépaississants :** ces fluides présentent une augmentation de la viscosité lorsque le taux de cisaillement augmente.

Les différents modes d'expression de la viscosité ont été détaillés dans le paragraphe concernant la mesure des masses moléculaires par la technologie SEC-MALLS.

L'étude rhéologique des solutions de polysaccharides permet aussi de déterminer leur concentration critique de recouvrement  $C^*$ , c'est-à-dire la concentration de transition entre le régime dilué et le régime semi-dilué (**Figure 49**). Quand  $C^*$  est atteint, des enchevêtrements de polysaccharides entrent en jeu et les polymères sont plus sensibles à un stress physique. Cela se traduit par une augmentation de la viscosité de la solution. La  $C^*$  (g/L) d'un polysaccharide est déduite du tracé en échelle logarithmique de la viscosité spécifique mesurée à cisaillement nul par rapport à la concentration du polymère obtenue en traçant la relation  $\log \eta_{sp} = f(\log C)$ ,  $\eta_{sp}$  étant la viscosité spécifique mesurée à cisaillement nul et  $C$  correspond à la concentration du polysaccharide. La rupture de la pente donne accès à  $C^*$  (**Figure 49**).



**Figure 49:** Exemple de détermination graphique de la concentration critique de recouvrement  $C^*$ .

La concentration, et plus précisément l'espace occupé par les molécules dissoutes, est également un paramètre primordial contrôlant le comportement rhéologique macroscopique des solutions de polymère. Ainsi, trois domaines sont généralement définis pour décrire l'écoulement des solutions de polymère en fonction de la concentration : solutions diluées, semi-diluées et concentrées (**Figure 50**). De manière générale, la solution diluée décrit le régime où les chaînes de polymère sont éloignées et isolées les unes par rapport aux autres. Chaque chaîne de polymère occupe dans l'espace la conformation de pelote statistique définie par son rayon de giration et fournit sa propre contribution à la viscosité macroscopique de la solution. Lorsque la concentration augmente, les pelotes vont rapidement se rapprocher jusqu'à rentrer en contact à une concentration donnée appelée  $C^*$ . Au-delà de  $C^*$ , les chaînes se recouvrent et s'interpénètrent jusqu'à former un réseau 3D. Ceci induit une augmentation brutale de la viscosité de la solution.

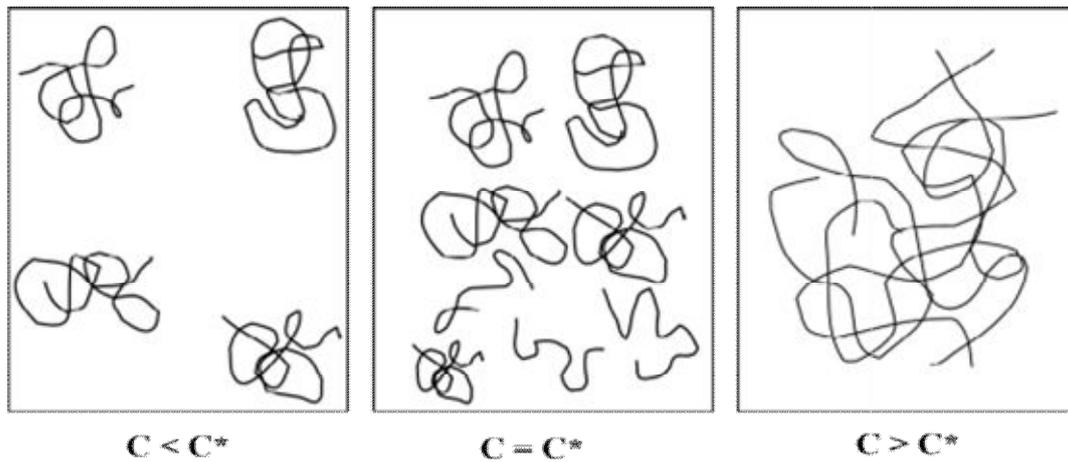


Figure 50: Etats d'enchainement des polymères en fonction de la concentration.

Notons que de nombreux modèles permettent de décrire le comportement rhéofluidifiant des solutions. Nous avons opté pour le modèle de Williamson (Williamson, 1929) pour décrire le comportement rhéofluidifiant de l'extrait polysaccharidique des graines d'*Astragalus gombo*. Ce modèle s'écrit :

$$\eta = \frac{\eta_0}{(1 + (k\dot{\gamma})^n)}$$

Avec :

$\dot{\gamma}$  : taux de cisaillement " shear rate " ( $s^{-1}$ ) ;

$\eta$  : viscosité apparente (Pa.s);

$\eta_0$ : viscosité à cisaillement nul (Pa.s);

$k$  : constante de temps (s) ;

$n$  : indice de fluidité.

### 2.6.2.2. Mesure de la viscosité

Pour la caractérisation rhéologique du polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo*, différentes solutions de GM ont été préparées (0,5 % à 4 % (m/v) dans de l'eau Milli-Q) sous agitation (250 rpm) pendant 24 h à température ambiante. Les mesures de viscosités apparentes de ces différentes solutions de GM ont été réalisées en utilisant un rhéomètre AR-2000 (TA Instrument) (**Figure 51**) avec un module de géométrie plan/plan de diamètre 40 mm (**Figure 52**). Le rhéomètre utilisé est équipé d'un moteur à induction et d'un palier à air pour toutes les parties en rotation. La mesure du déplacement est effectuée grâce à un dispositif à encodeur optique est équipé d'un système de contrôle de température à effet Peltier. C'est un rhéomètre à contrainte imposée et vitesse contrôlée capable d'appliquer un couple donné pour mettre en mouvement le fluide (et calculer la contrainte correspondante)

## Chapitre 2 : matériels et méthodes

---

puis mesurer la vitesse de déplacement du fluide en réponse à cette sollicitation (et calculer ainsi le taux de cisaillement). Les solutions GM ont été très soigneusement chargées entre les deux plaques du rhéomètre pour éviter les bulles d'air et l'excès de liquide éliminé pour assurer une interface fluide. La viscosité est mesurée dans la gamme de cisaillement  $10^{-3}$  à  $10^2$   $s^{-1}$  à trois températures (25 °C, 40 °C et 60 °C). Afin de limiter l'évaporation lors de l'analyse, un film d'huile (hexadécane) a été utilisé pour revêtir la périphérie.

Les mesures ont été réalisées en triplicata. Les données sont traitées à l'aide du logiciel "TA instrument Rheology Advantage Data Analysis software".



Figure 51: Rhéomètre AR-G2 (TA Instruments, France)

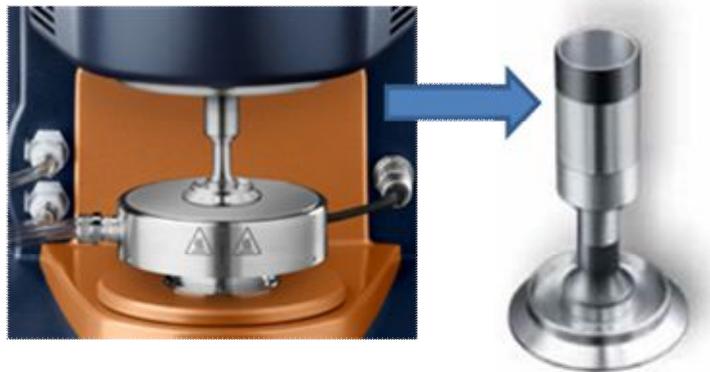


Figure 52: Rhéomètre de géométrie plan/plan

La résistance du produit s'observe au niveau de l'entrefer (distance entre les deux plans). L'entrefer du système (ou gap) est de 5 mm. Une cartographie du système appelée "rotational mapping" est réalisée à chaque fois que le rhéomètre est mis en fonction. Dans le cas d'un rhéomètre à géométrie plan/plan, on considère deux plaques planes parallèles séparées par une mince couche de liquide. La plaque inférieure est maintenue au repos et la plaque supérieure se déplace d'un mouvement de rotation uniforme de vitesse  $v.s^{-1}$ . Les différentes couches de liquide sont entraînées par le mouvement de la plaque à des vitesses différentes selon leur position par rapport à la plaque mobile. Des forces de résistance au déplacement

apparaissent entre les différentes couches de liquide ; elles sont fonction de la nature du liquide et donc de sa viscosité. Le nombre d'itérations choisi est de 2 et le système est en mode "soft" pour une meilleure sensibilité. Les données de viscosité sont recueillies et analysées en utilisant le logiciel de rhéologie "Rheology Advance software".

Des mesures de la viscosité complexes sont également réalisées. Ces mesures en mode dynamique (ou oscillatoire) permettent d'appliquer des déformations faibles de sorte que la linéarité entre la contrainte et la déformation soit respectée. Le principe consiste à soumettre l'échantillon à une déformation sinusoïdale ( $\gamma$ ) au cours du temps. La contrainte résultante ( $\sigma$ ) est également sinusoïdale et de même fréquence ( $\omega$ ) mais présentant un déphasage ou angle de perte ( $\delta$ ) :

$$\begin{aligned}\gamma &= \gamma_0 \sin \omega t \\ \sigma &= \sigma_0 \sin(\gamma + \delta)\end{aligned}$$

Avec :

$\gamma$  : taux de cisaillement ( $s^{-1}$ )

$\gamma_0$  : amplitude de la déformation ( $s^{-1}$ )

$\omega$  : fréquence ( $rad.s^{-1}$ )

$\sigma$  : contrainte (Pa)

$\sigma_0$  : amplitude de la contrainte (Pa)

$\delta$  : déphasage ou angle de perte (rad)

Il existe trois cas possibles :

$\delta=0$ , le matériau se rapproche d'un solide de Hooke. En réponse à une contrainte et quelle que soit la vitesse appliquée, il se déforme de manière élastique instantanément et proportionnellement à la contrainte (phénomène indépendant du temps).

$\delta = \pi/2$ , le matériau est un fluide visqueux. En réponse à une sollicitation, il s'écoule irréversiblement.

$0 < \delta < \pi/2$ , alors le matériau possède à la fois un comportement élastique et visqueux, il est viscoélastique.

La présentation de la déformation et de la contrainte par des vecteurs tournants permet de représenter  $\gamma$  et  $\sigma$  pour des modules complexes (\*) :

$$\begin{aligned}\gamma^* &= \gamma_0 e^{i\omega t} \\ \sigma^* &= \sigma_0 e^{(i\omega t + \delta)}\end{aligned}$$

On peut alors définir le module complexe de cisaillement :

$$G^* = \frac{\sigma^*}{\gamma^*} = G' + iG'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} (\cos\delta + i \sin\delta)$$
$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos\delta, \quad G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin\delta$$
$$\tan\delta = \frac{G''}{G'}$$

$G'$  (Pa) est la composante élastique (appelée module de conservation, représentant l'énergie emmagasinée sous forme élastique) et  $G''$  (Pa) la composante visqueuse (appelée module de perte, représentant l'énergie dispersée donc irrécupérable sous forme d'écoulement visqueux) de  $G^*$ . On définit  $\tan\delta$  comme le facteur de perte.

Les mesures viscoélastiques dynamiques ont été réalisées en utilisant le rhéomètre AR-G2 (TA Instruments, France) à géométrie plan/plan sur des solutions de polysaccharide allant de 0,5 % et 4 % (m/v) dans l'eau milli-Q. Elles ont permis de caractériser leur comportement viscoélastique en mesurant les modules de conservation (ou module élastique)  $G'$  (Pa) et de perte (ou module visqueux)  $G''$  (Pa) pour un cisaillement oscillant de petite amplitude d'écoulements aux fréquences s'étendant de 1 à 100 rad/s avec une déformation de 1 % à 25 °C.

## 2.7. Etude des activités biologiques

### 2.7.1. Activités prébiotiques des polysaccharides

La notion de prébiotique fut présentée pour la première fois par Gibson et Roberfroid en 1995. De manière générale, un prébiotique désigne un additif ou un ingrédient alimentaire non digestible qui influence favorablement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance cellulaire et/ou l'activité d'un nombre limité de bactéries bénéfiques présentes dans le colon.

Le concept de prébiotique a été affiné dans les travaux de Gibson *et al.* (2004) où les prébiotiques sont désormais couramment définis comme des ingrédients sélectivement fermentés permettant des modifications spécifiques dans la composition et dans l'activité du microbiote gastro-intestinal conférant ainsi un bien-être pour l'hôte. En vue de l'obtention d'une allégation en qualité de prébiotique, un ingrédient alimentaire doit répondre à plusieurs conditions à savoir : (i) être fermenté dans le microbiote intestinal, (ii) stimuler de manière sélective la croissance et l'activité des bactéries intestinales associées avec le bien-être et la santé humaine et finalement (iii) résister à l'acidité gastrique, à l'hydrolyse par les enzymes des mammifères et à l'absorption gastro-intestinale. L'un des objectifs principaux concernant l'utilisation des prébiotiques dans l'alimentation humaine est de pouvoir diminuer

considérablement la quantité d'espèces microbiennes potentiellement pathogènes ou néfastes pour la santé de l'hôte (Gibson et Roberfroid, 1995).

Ainsi, dans une première approche expérimentale, il est important de vérifier la digestibilité de polysaccharides avant d'en étudier ses propriétés prébiotiques sur la croissance de bactéries intestinales bénéfiques pour l'hôte.

### 2.7.1.1. Etude de la digestibilité in vitro des polysaccharides

Dans notre étude, la digestibilité des polysaccharides issus d'*Astragalus gombo* est étudiée en déterminant le degré de leur dépolymérisation (associé au degré d'hydrolyse) après incubation dans un jus gastrique artificiel. L'inuline et les fructooligosaccharides (FOS) sont utilisés comme référence prébiotique dans notre étude.

#### **Mode opératoire :**

Chaque composé (standards et polysaccharides issus d'*A. gombo*) est dissous en solution à 1 % (m/v) dans l'eau distillée et leur digestibilité est testée selon la méthode décrite par Korakli *et al.* (2002). Un jus gastrique artificiel est préparé en utilisant un tampon HCl contenant des réactifs suivant : NaCl (8 g/L), KCl (0,2 g/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (8,25 g/L), NaHPO<sub>4</sub> (14,35 g/L), CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0,1 g/L) et MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0,18 g/L).

Le pH du tampon est ajusté à 1, 2, 3, 4 et 5 en utilisant une solution d'HCl (5 M). Un mL de l'échantillon est mélangé avec 5 mL du jus gastrique artificiel pour tous les pH et le mélange réactionnel est incubé dans un bain-marie à une température de 37 °C durant 6 h. Deux mL du mélange réactionnel sont prélevés périodiquement après 0, 0,5, 1, 2, 4 et 6 h d'incubation dans un système d'agitation thermostaté de type Radley (Type parallèle, Carousel 12 plus) et leur contenu en sucres réducteurs (cf. 2.4.2.) et en sucres totaux (cf. 2.4.1.1) sont déterminés. Les analyses sont réalisées en triplicata. Le pourcentage d'hydrolyse de l'échantillon est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Hydrolyse \%} = \frac{\text{Sucre réducteurs libérés}}{[\text{Sucres totaux}] - [\text{Sucres réducteurs initiaux}]} \times 100$$

### 2.7.1.2. Etude des activités prébiotiques des polysaccharides sur *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103

*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 est utilisé pour étudier les propriétés prébiotiques potentielles des polysaccharides issus de graines d'*Astragalus gombo*. Cette bactérie est un microorganisme anaérobie facultatif, appartenant à un genre commensal du tractus intestinal. La température de croissance est fixée à 37°C pour notre étude.

#### **Mode opératoire :**

## Chapitre 2 : matériels et méthodes

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) à pH 6,3 dont la composition est donnée dans le **Tableau 9**.

Le milieu est stérilisé par autoclavage durant 20 min à 120 °C. Les substrats carbonés utilisés à la concentration de 2 % (m/v) sont : (i) les prébiotiques standards (oligofructoses (FOS F97) et inuline), (ii) le polysaccharide et sont hydrolysats issus des graines d'*Astragalus gombo*, (iii) le glucose. Les différents substrats carbonés ont été testés en présence et en absence d'acide ascorbique utilisé comme agent réducteur à 0,2 % (m/v). Le milieu MRS et le polysaccharide des graines d'*A. gombo* ont été autoclavés (20 min à 120 °C) tandis que les solutions de glucose, d'inuline, de FOS, d'hydrolysats de polysaccharide issus des graines d'*Astragalus gombo* et de vitamine C ont été filtrées à 0,22 µm.

**Tableau 9: Composition du milieu MRS.**

Milieu	Constituant	Quantité
MRS	Peptone animale (Fluka)	10 g
	Extrait de viande (Fluka)	8 g
	Extrait de levure (Fluka)	4 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
	CH <sub>3</sub> COONa, 3H <sub>2</sub> O	5 g
	Citrate de triammonium	2 g
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,05 g
	TWEEN 80	1 mL

La culture de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 est préparée à partir de 1 mL de culture en phase exponentielle sur milieu MRS utilisé pour inoculer 10 mL de milieu MRS. Ces 10 mL de culture ont été incubés pendant 48 à 72 heures à 37 °C. La croissance microbienne est suivie en mesurant son absorbance à 600 nm. Cette culture est utilisée pour les tests prébiotiques après dilution dans le milieu MRS sans sucre à une DO égale à 0,1. Vingt µL de cette culture sont utilisés pour inoculer 180 µL de milieu MRS contenant des sucres à tester dans des puits de microplaques. Le mélange est ensuite additionné de 55 mL d'huile minérale (Silicone) pour empêcher l'évaporation du milieu. La croissance bactérienne est suivie dans un lecteur de microplaques de type bioscreen (PerkinElmer) sur une période de 32 h. Les tests sont réalisés en triplicat.

### 2.7.2. Dosage de l'activité anti-oxydante des polysaccharides

L'effet antioxydant d'une substance, présente en faible concentration comparée à celle d'un substrat oxydable, est de retarder ou de prévenir de manière significative l'oxydation de ce substrat (Caesar, 2007). Les antioxydants peuvent réduire le stress oxydatif en inhibant les

réactions de la chaîne oxydative (Liu *et al.*, 2013). La vitamine C (acide ascorbique) est probablement la plus efficace et la moins toxique de tous les antioxydants solubles dans l'eau identifiée à ce jour (Caesar, 2007).

### 2.7.2.1. Test anti-radicalaire par le dosage au 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

Le dosage de la réduction des radicaux DPPH est parmi les méthodes les plus fréquemment utilisées et offre la première approche pour l'évaluation de l'activité antioxydante d'une molécule (Shahidi et Zhong, 2015).

#### **Mode opératoire :**

La mesure de l'activité anti-radicalaire des polysaccharides issus d'*A. gombo* a été réalisée par le dosage au 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) selon un protocole adapté de Delattre *et al.* (2015). Les fractions polysaccharidiques sont dissoutes à différentes concentrations (de 0 à 10 g/L) dans l'eau milli-Q.

Le principe du dosage est le suivant :

- déposer dans les tubes 1 mL d'échantillon ;
- ajouter 1 mL d'une solution de DPPH (0,1 mM dans l'éthanol à 96°) ;
- vortexer les tubes (5 secondes) ;
- laisser reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min ;
- mesurer l'absorbance à 517 nm (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240A, Shimadzu).

La vitamine C (acide ascorbique) est un anti-oxydant naturel utilisé comme témoin positif.

Le pourcentage d'activité anti-radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition du radical DPPH (\%)} = (1 - (A_{\text{échantillon}}/A_{\text{témoin}})) \times 100.$$

Avec :

$A_{\text{échantillon}}$  = Absorbance à 517 nm du mélange : 1 mL de solution polysaccharidique + 1 mL de DPPH (0,1 mM dans l'éthanol à 96°)

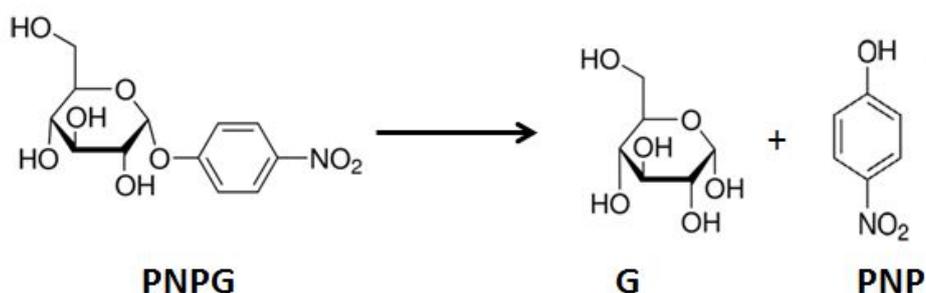
$A_{\text{témoin}}$  = Absorbance à 517 nm du mélange : 1 mL d'eau distillée + 1 mL de DPPH (0,1 mM dans l'éthanol à 96°).

### 2.7.3. Inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase

L'  $\alpha$ -glucosidase (EC 3.2.1.20) est une enzyme sécrétée dans l'épithélium de l'intestin grêle. Elle catalyse le clivage de certains oligosaccharides et disaccharides en monosaccharides lors de l'étape finale de la digestion des glucides. Des études ont montré que les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase classés comme agents hypoglycémiant oraux (par exemple, l'acarbose et le

voglibose) peuvent retarder ou réduire la digestion et l'absorption des glucides et diminuer ainsi le taux de la glycémie dans le sang (Khan *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2015).

Le test d'inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase a été réalisé en mesurant par spectrophotométrie à 405 nm la formation du produit p-nitro phenol (PNP) de couleur jaune à partir du substrat synthétique : le p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) (**Figure 53**). Le test a été réalisé en microplaque. La diminution de l'absorbance à 405 nm par rapport aux puits contrôles (sans inhibiteur) témoignait d'une inhibition de l'enzyme. L'Acarbose, un inhibiteur synthétique commercial a été utilisé comme référence (contrôle positif).



**Figure 53: Dégradation du p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) par l' $\alpha$ -glucosidase.**

Le test a été réalisé en microplaque selon la méthode décrite par Zhang et Li (2015) avec une légère modification : Un mélange de l'échantillon (10  $\mu$ L) à différentes concentrations et de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,15, 500  $\mu$ L) contenant de la solution d' $\alpha$ -glucosidase (2 U/mL) ont été incubé à 37 °C pendant 15 min. Après la pré-incubation, une solution de PNPG à 8 mM (125  $\mu$ L) dans le même tampon de phosphate 0,1 M (pH 7,15) a été ajoutée à chaque puit. Les mélanges réactionnels ont été incubés pendant 30 min à 37 °C. La réaction a été stoppée par l'ajout de 80  $\mu$ L d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 1 M.

La quantité de produit formé (4-nitrophenol) a été mesurée par spectrophotométrie à 405 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase a été calculé selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'inhibition} = 1 - \left[ \frac{\text{DO test} - \text{DO blanc}}{\text{DO contrôle} - \text{DO Blanc}} \right] \times 100$$

Avec :

DO test : Densité optique de l'échantillon test en présence de l'inhibiteur

DO blanc : Densité optique du tampon sans enzyme.

DO contrôle : Densité optique de l'échantillon contrôle (tampon sans inhibiteur)

### 2.7.4. Activité phagocytaire

#### **Principe :**

Le test de phagocytose est basé sur l'activation des cellules phagocytaires par l'exposition des macrophages à une matière particulaire. Ce test est utilisé pour déterminer la capacité des leucocytes à phagocyter les particules après stimulation par des extraits polysaccharidiques (Harun *et al.*, 2015).

#### **Prélèvement de sang :**

Des volontaires humains sains, de sexe masculin, âgé de 25 à 38 ans ont été choisis pour effectuer des prélèvements sanguins, Le sang est obtenu par une ponction veineuse aseptique le même jour de son utilisation au niveau de laboratoire Ibn Rochd Ghardaïa (Koko *et al.*, 2008). Le sang total est recueilli dans un tube hépariné (anticoagulant) (Maqbool *et al.*, 2011).

#### **Préparation de *Candida albicans* :**

*Candida albicans* est inoculé dans un milieu liquide de Sabouraud à partir d'une culture mère maintenu sur la gélose inclinée de Sabouraud et incubée 12 h à 30 °C. La culture est ensuite centrifugée à 400 g pendant 10 mn (Ghoneum et Gollapudi, 2004). Le culot est lavé deux fois avec 1 mL de tampon PBS stérile (Tavanti *et al.*, 2006), centrifugé à 460 g à 4 °C pendant 10 mn, puis incubé pendant 1 h à 90 °C afin d'inactiver les levures (Ghoneum et Gollapudi, 2004). Les levures sont alors lavées deux fois dans 1 mL de PBS et centrifugées (Ragsdale et Grasso, 1989).

La concentration de cellules dans le PBS est ajustée à une absorbance de 1,0 à 540 nm ce qui correspond à  $1.10^7$  *C. albicans*/mL (Ghoneum et Gollapudi, 2004 ; Tavanti *et al.*, 2006).

#### **Préparation de zymosan :**

Le zymosan est un dérivé de la membrane des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, il s'agit d'un complexe des protéines et de  $\beta$ -D-glucanes. Il est utilisé comme témoin positif à une concentration de 1 mg/mL est (Edvard *et al.*, 1978).

#### **Exploration de la phagocytose et récupération des cellules phagocytaires (protocole modifié) :**

Les différents extraits polysaccharidiques (40  $\mu$ L) d'une concentration de 1 mg/ml sont mélangés avec 200  $\mu$ L de sang hépariné et incubés dans un incubateur sous agitation (60 rpm) à 37 °C pendant 30 mn. Les tubes sont ensuite déposés dans un bain de glace pour arrêter la réaction (Harun *et al.*, 2015). Les cellules stimulées sont lavées deux fois par 1 mL d'un tampon phosphate (PBS) à 4 °C, puis centrifugé à 250 g pendant 5 mn à 4 °C (Rossi *et al.*, 2013).

## **Chapitre 2 : matériels et méthodes**

---

Quarante  $\mu\text{L}$  d'une solution de *Candida albicans* à 0 °C sont ajoutés aux échantillons avec incubation sous agitation à 37 °C pendant 10 mn. Après incubation, la phagocytose est arrêtée par addition de 2 mL de PBS glacé, et les cellules sont lavées trois fois par 1 mL du même tampon à 4°C (Chena *et al.*, 2014) avant d'être centrifugées trois fois à 100 g pendant 5 mn à 4 °C (Czuprynski *et al.*, 1991).

### ***Lyse des érythrocytes :***

Selon, Maqbool *et al.* (2011) les érythrocytes sont lysés par 2 mL d'une solution de lyse pour obtenir une population pure de granulocytes. La lyse des hématies est effectuée pendant 20 s par la solution HSi d'hémolyse et de lavage (Réf : 018431L, TOSOH EUROPE, Belgique). La lyse est stoppée en utilisant 2 mL d'un tampon HBSS suivi d'une centrifugation à 400 g pendant 10 mn. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois par 3 mL de PBS (Harun *et al.*, 2015).

### ***Préparation de frottis sur lame :***

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

Prélever 5  $\mu\text{L}$  de chaque culot cellulaire à l'aide du compte-goutte ;

Déposer la goutte à l'extrémité d'une lame en verre propre ;

- Etaler à l'aide d'une autre lame, immédiatement et régulièrement ;
- Sécher le frottis à l'air libre (Moinfar *et al.*, 2012).

### ***Fixation par le méthanol :***

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

### ***Coloration de MGG :***

La coloration de May-Grünwald-Giemsa repose sur un mélange de colorants (éosine, bleu de méthylène et azur). Il s'agit d'une coloration en deux temps, en milieu alcoolique puis aqueux (Sebahoun, 2005).

Les noyaux apparaissent selon différents degrés de coloration mauve et le cytoplasme en bleu (Wildemann et Oschmann, 2011).

### ***Lecture du frottis sous microscope :***

Après séchage, les lames sont examinées sous immersion d'huile au microscope optique (x1000).

### ***Calcul de la capacité phagocytaire :***

Une centaine de cellules adhérentes sont comptées pour déterminer le pourcentage de la phagocytose. Les valeurs de phagocytose représentent le pourcentage des cellules qui

## Chapitre 2 : matériels et méthodes

---

contiennent des particules de zymosan ou de levures. (Nose *et al.*, 1997 ; Popov *et al.*, 1999 ; Abid *et al.*, 2012).

***La capacité phagocytaire se définit par :***

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

***Calcul de l'activité phagocytaire :***

. L'activité phagocytaire des polysaccharides et celle de contrôle positive est calculé selon Steven *et al.* (1984) comme suit :

$$PA\% = CP_{\text{test}}\% - CP_{\text{blanc}}\%$$

Avec :

PA %: activité phagocytaire catalysée par les polysaccharides et du contrôle positive.

CP<sub>test</sub> %: capacité de phagocytose en présence des polysaccharides ou du contrôle positif

CP<sub>blanc</sub> % : capacité de phagocytose en absence des polysaccharides ou avec le contrôle négatif.

# **CHAPITRE 3**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

### 3. Résultats et discussion

Dans ce chapitre, nous exposerons les différents résultats obtenus lors de l'extraction et de la caractérisation des polysaccharides hydrosolubles extraits d'*Astragalus gombo* Bunge.

#### 3.1. Extraction et composition globale des polysaccharides extraits d'*Astragalus gombo* bunge

##### 3.1.1. Extraction des polysaccharides des tiges d'*Astragalus gombo* bunge

Dans le but d'extraire et d'identifier la nature des polysaccharides hydrosolubles des tiges d'*A. gombo*, nous avons adapté un protocole d'extraction fréquemment utilisé dans la médecine traditionnelle. Il s'agit d'une macération dans de l'eau à raison de 1 g de matière pour 15 mL de solvant. Les extractions sont réalisées à reflux (100 °C) sous agitation pendant 4 heures en faisant varier le pH (pH de l'eau distillée, pH alcalin et pH acide). L'étape de purification est ensuite optimisée en respectant la même procédure expérimentale de filtration, précipitation à l'éthanol 96% (-20 °C), lavage à l'acétone et séchage à l'étuve à 50 °C pendant une nuit afin de comparer les rendements d'extraction.

Les composés pectiques sont beaucoup plus hydrosolubles dans l'eau chaude (90 à 100 °C), en milieu acide (pH compris entre 1,5 et 4) et pour des temps de contact variables de 0,5 à 6 heures (Levigne *et al.*, 2002). Quant aux alcalis (soude et potasse en général), ils sont efficaces pour extraire les hémicelluloses et certains polysaccharides pectiques résistants aux agents chélatants (Carpita, 1984). Leur action est due à la fois à leurs effets chaotropique et destructif : coupure des liaisons esters, des liaisons O-glycopeptidiques, et dépolymérisants ( $\beta$ -élimination) de certains polysaccharides réducteurs ou acides.

Le protocole décrit précédemment (**Figure 37**), nous a permis d'obtenir trois fractions polysaccharidiques comme résumé dans le **Tableau 10** : (1) une première fraction issue d'une extraction à l'eau chaude et à pH= 5,9 suivie d'une précipitation éthanolique à -20 °C obtenue avec rendement d'extraction de 2% (m/m) (**Fraction PS1**) ; (2) une deuxième fraction issue d'une extraction aqueuse dans l'hydroxyde de sodium (NaOH) dilué (50 mM ; pH=12,3) obtenue avec un rendement d'extraction de 4% (m/m) (**Fraction PS2**) ; (3) une troisième fraction (**Fraction PS3**) issue d'une extraction aqueuse dans l'acide chlorhydrique (HCl) dilué (50 mM ; pH=1,3) obtenue avec un rendement d'extraction de 5,67 % (m/m).

**Tableau 10: Rendement et couleur des extraits polysaccharidiques des tiges d'*Astragalus gombo*.**

<b>Fractions</b>	<b>Condition d'extraction</b>	<b>Rendement massique (%)</b>	<b>Couleur de l'extrait</b>
<b>PS1</b>	Eau distillée (pH=5,9)	2,0	Brune foncée
<b>PS2</b>	NaOH (pH=12,3)	4,0	Brune vers le rouge
<b>PS3</b>	HCl (pH=1,3)	5,7	Blanc

La variabilité des couleurs d'extraits et des rendements d'extraction calculés par rapport à la matière sèche des tiges broyées trouve son explication dans les méthodes d'extraction. En effet, l'utilisation de différents pH et de hautes températures (100 °C) vont (notamment pour les pH acides et basiques) dénaturer certaines molécules telles que les composés phénoliques, les protéines et les sucres simples entraînant ainsi la contamination des polysaccharides par des molécules colorées comme suggéré dans les travaux de Dahlman *et al.*, (2003). La variation dans les rendements d'extraction peut être expliquée par la nature et l'intensité des interactions macromolécules/solvant et macromolécules/macromolécules (Thibault *et al.*, 1991). En effet ces interactions influencent fortement le degré de solubilité des polysaccharides dans le milieu d'extraction.

Concernant les traitements possibles pour décolorer les échantillons polysaccharidiques, notons les prétraitements du matériel végétal par l'utilisation d'éthanol bouillant dans le but d'extraire les composés phénoliques ou d'inactiver les enzymes capables de dégrader les polysaccharides pariétaux. Ces traitement doivent être contrôlés de manière précise afin d'augmenter la pureté des polysaccharides extraits (Thibault *et al.*, 1991). De plus, selon la famille de polysaccharides à extraire, le choix du pH permet notamment de fragiliser la paroi végétale afin d'extraire sélectivement le polymère. Ainsi, l'eau ne permet pas d'extraire quantitativement les xylanes trop ancrés à l'intérieur des cellules végétales, et distribués dans les couches les plus internes de la paroi cellulaire. Par conséquent, les hémicelluloses qui sont des polysaccharides pariétaux, sont le plus souvent extraits avec des solutions alcalines. Ce résultat est rendu possible par les propriétés des solutions alcalines qui sont en mesure de fragiliser les cellules en comptant les liaisons ester qui stabilisent les interactions fortes entre les hémicelluloses et les pectines.

### 3.1.2. Composition globale des extraits polysaccharidiques des tiges d'*Astragalus gombo*

La composition biochimique des trois extraits bruts hydrosolubles des tiges (**PS1**, **PS2** et **PS3**) a été déterminée par dosages colorimétriques. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 11**. Ces analyses indiquent la présence de 69,4 % de sucre totaux dont 55,6 % d'oses neutres et 49,2 % d'oses acides pour l'extrait **PS1** avec de faibles teneurs en protéines (1,8 %) et des teneurs non négligeables en composés phénoliques (9,2 %).

**Tableau 11: Composition globale des extraits polysaccharidiques des tiges d'*Astragalus gombo***

Fraction	Composition du polysaccharide (m/m %)				
	Sucres totaux <sup>1</sup>	Oses neutres <sup>2</sup>	Acides uroniques <sup>3</sup>	Protéines <sup>4</sup>	Composés phénoliques <sup>5</sup>
<b>PS1</b>	69,4	55,6	49,2	1,8	9,2
<b>PS2</b>	61,2	-	-	2,9	9,3
<b>PS3</b>	46,6	-	-	0,5	1,1

<sup>1</sup> Quantifiés par la méthode de Dubois (1956)

<sup>2</sup> Quantifiés par la méthode de Monsigny et al. (1988)

<sup>3</sup> Quantifiés par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973)

<sup>4</sup> Quantifiées par la méthode de Bradford (1976)

<sup>5</sup> Quantifiées par la méthode Adapté de Singleton et al., 1999

La fraction **PS2** est constituée de sucres totaux (61,2 %), avec également de faibles teneurs en protéines (2,9 %) et des quantités non négligeables de composés phénoliques (9,3 %). Pour la fraction **PS3**, la teneur en sucre totaux est beaucoup plus faible (46,6 %). Ces contenus faibles en protéines et en composés phénoliques des trois fractions **PS1**, **PS2** et **PS3** sont dus au prétraitement de dépigmentation réalisé sur la tige broyée avant l'extraction. La présence de composés phénoliques pourrait être encore réduite par des traitements de dépigmentation beaucoup plus spécifiques.

#### 3.1.3. Analyse des extraits polysaccharidiques par spectroscopie infra-rouge (FT-IR)

L'exploitation des spectres infrarouges des fractions **PS1**, **PS2** et **PS3** permet d'une part d'observer les bandes correspondant au squelette de base des résidus osidiques, et d'autre part de mettre en évidence les différences entre ces unités saccharidiques comme par exemple la présence de certains groupements, considérés comme marqueurs de certaines catégories de polysaccharides tels que les groupements sulfate, les acides uroniques, les osamines...etc. ou d'autres molécules associées (acides féruliques, lignines, protéines). Les profils des spectres FT-IR ainsi que les intensités relatives des bandes d'absorption obtenues lors de l'analyse des polysaccharides des fractions **PS1**, **PS2** et **PS3** sont représentés dans la **Figure 54**.

De larges signaux dans la gamme de longueurs d'ondes 950-1200  $\text{cm}^{-1}$  révèlent la nature polysaccharidique comme composant majeur de ces trois fractions (**Tableau 12**).

**Tableau 12: Longueurs d'onde caractéristiques des groupes fonctionnels des polysaccharides analysés par spectroscopie Infra-Rouge**

Longueur d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Types de liaison ( $\nu$ = vibration d'élongation)
2500 et 3400	$\nu$ (O-H)
1200 et 1500	$\nu$ (C-H) aliphatique
1660 et 1740	$\nu$ (C=O) fonction carboxylate
1200 et 1320	$\nu$ (-COO-) des acides uroniques
950 et 1200	$\nu$ (C-O) fonctions d'hydrates de carbone

Cette partie du spectre est dominée par les contributions des fonctions C-C et C-O provoquant des vibrations d'élongations dans les cycles pyranoses (Xu *et al.*, 2009 ; Ge *et al.*, 2009). Les pics situés entre 1200 et 1500  $\text{cm}^{-1}$  sont provoqués par des vibrations de déformation du C-H et des vibrations de rotation des groupements C-OH. D'autres pics à 2920 et 2970  $\text{cm}^{-1}$  indiquent des vibrations d'élongation en C-H et un pic très large d'environ 3400  $\text{cm}^{-1}$  est attribué aux modes de vibration d'élongation des fonctions OH des polysaccharides et de l'eau résiduelle contenue dans ces derniers (Xu *et al.*, 2009 ; Ge *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2009). Dans les analyses de glucides par IR, les configurations  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent être clairement distinguées dans la région de 950 à 750  $\text{cm}^{-1}$ . Ainsi, la région 870-840  $\text{cm}^{-1}$  correspond au anoméries  $\alpha$ , tandis que la configuration  $\beta$  se situent autour de 890  $\text{cm}^{-1}$  (Xu *et al.*, 2009 ; Kacurakova, 2001).

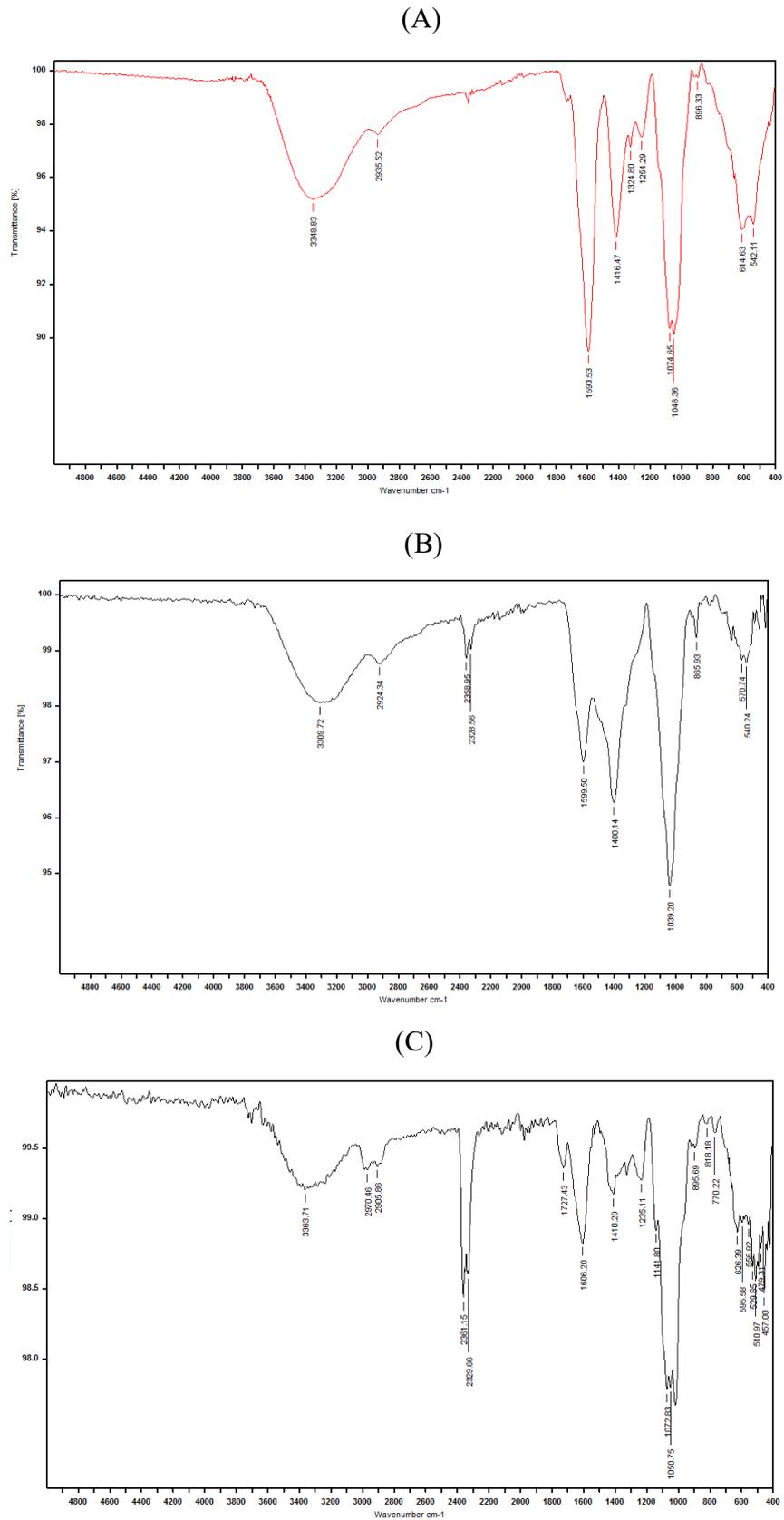


Figure 54: Spectres infra-rouges des polysaccharides (A) PS1, (B) PS2 et (C) PS3 issus des tiges d'*Astragalus gombo* Bunge.

L'exploitation seule de ces spectres infrarouge ne permet pas de donner une structure précise des trois fractions polysaccharidiques. Par conséquent, la caractérisation structurale des polysaccharides hydrosolubles (**PS1**, **PS2** et **PS3**) des tiges d'*Astragalus gombo* Bunge, s'est poursuivie par des analyses chromatographiques (CG-MS) afin de déterminer leur composition en monosaccharides constitutifs.

### 3.1.4. Composition osidique

#### 3.1.4.1. Analyse Chromatographique en Phase Gazeuse

La **Figure 55** présente le chromatogramme obtenu et le **Tableau 13** donne la composition en monosaccharides constitutifs du polysaccharide extrait des tiges après hydrolyse acide (TFA) et dérivatisation des monosaccharides. L'extrait **PS1** est constitué essentiellement d'acide galacturonique (32,7 %), de galactose (14,7 %), d'arabinose (13,8 %), d'acide glucuronique (14,9 %), de rhamnose (10,7 %), de xylose (7,3 %) et de glucose (6,8 %).

La composition en monosaccharides (mol %) de la fraction **PS3** a montré qu'elle est très riche en acide galacturonique (52,11%), en galactose (16,88 %), en rhamnose (11,94 %) et en arabinose (8,91 %).

**Tableau 13: Analyse par CG/SM-EI de la composition en monosaccharide (% molaire) des polysaccharides extraits des tiges d'*Astragalus gombo* Bunge.**

Monosaccharides (% molaire)							
Fraction	Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	GalA	GlcA
<b>PS1</b>	14,7	13,8	10,7	6,8	7,3	32,7	14,9
<b>PS2</b>	13,4	21,5	9,7	4,1	31,7	13,5	5,9
<b>PS3</b>	16,8	8,9	11,9	4,7	3,9	52,1	1,4

Gal: Galactose; Ara: Arabinose; Rha: Rhamnose ; Glc: Glucose ; Xyl: Xylose; GalA: Acide galacturonique ; GlcA : Acide glucuronique.

Cette composition en monosaccharides de **PS1** et **PS3** est en concordance avec celle évoquée par la bibliographie qui révèle la présence majoritaire de polysaccharides de nature pectique pour des extractions aqueuse et acide de tissus végétaux (McNeil *et al.*, 1980).

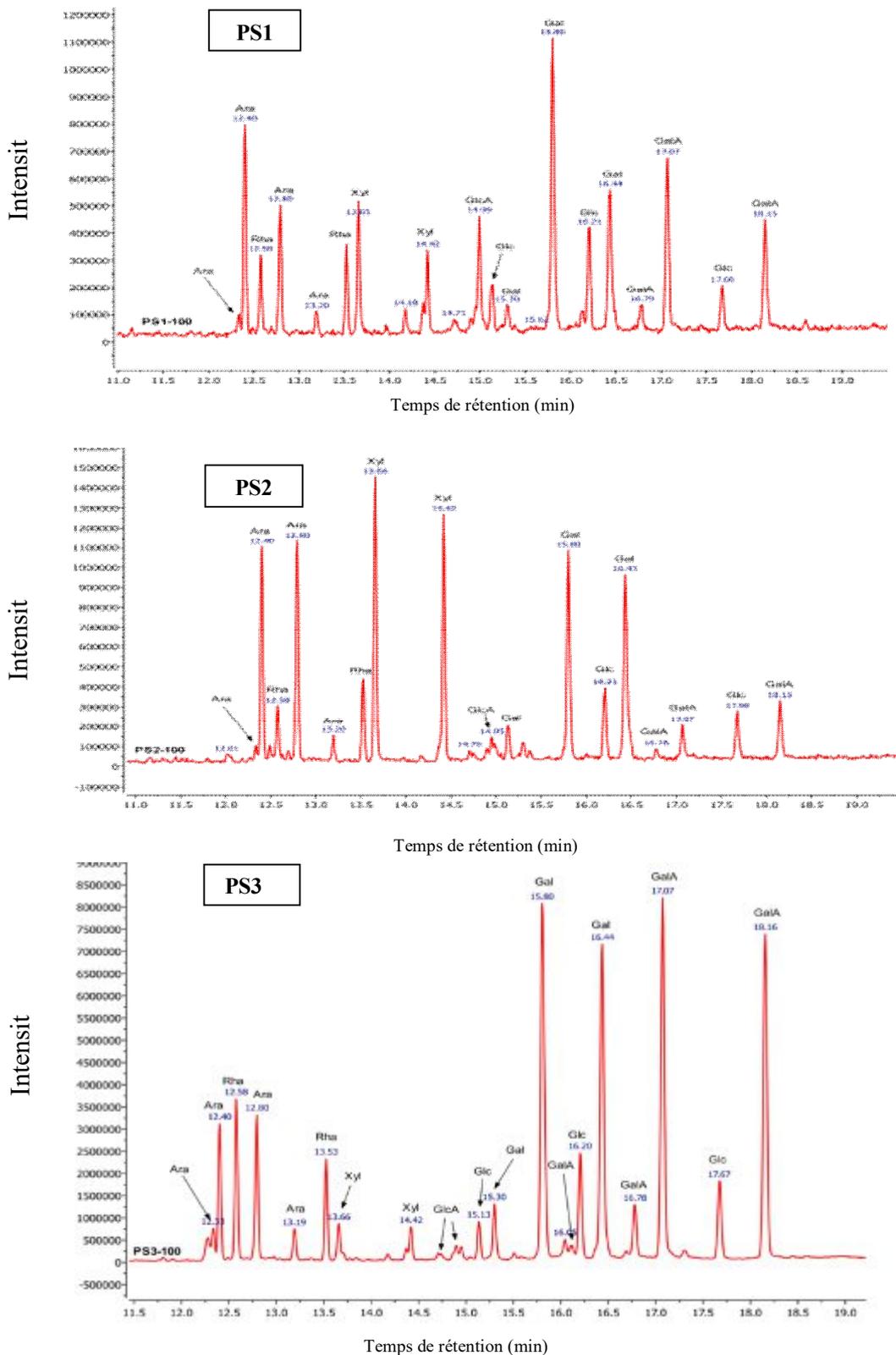


Figure 55: Chromatogrammes des polysaccharides PS1, PS2 et PS3 extraits des tiges, hydrolysés au TFA, triméthylsilylés et analysés par CG/SM-EI. Avec Gal: Galactose; Ara: Arabinose; Rha: Rhamnose ; Glc: Glucose ; Xyl: Xylose; GalA: Acide galacturonique.

Les polysaccharides pectiques sont des constituants importants des parois végétales. Ils représentent environ 30 % des parois primaires des dicotylédones (McNeil *et al.*, 1980). Les critères de classification de ces polysaccharides selon leur mode d'extraction les définissent en tant que composés (de la paroi primaire) extractibles avec l'eau chaude, à l'acide dilué, à l'oxalate d'ammonium et par des agents chélatants (Northcote, 1963). Les polysaccharides pectiques possèdent une structure polymérique dont la chaîne principale est formée majoritairement d'acides  $\alpha$ -D-galacturoniques liés en (1 $\rightarrow$ 4) dans laquelle sont insérés des résidus  $\alpha$ -L-rhamnosyles liés en (1 $\rightarrow$ 2) (Aspinall, 1983 ; Fry, 1988). La configuration de ces monosaccharides est principalement pyranique (Kennedy et White, 1988a). Les polysaccharides riches en acides galacturoniques sont désignés sous le nom de polysaccharides pectiques acides (P.P.A.) (Morvan, 1982). La majorité contient des proportions variées d'oses neutres, comprises entre 10 % et 25 % (Kennedy et White, 1988b). Des chaînes latérales de natures diverses telles des arabinanes, galactanes, et arabinogalactanes substituent cette structure et sont en partie à l'origine de la variabilité de ces polymères. On distingue ainsi au sein des polymères pectiques, l'homogalacturonane, le rhamnogalacturonane I (RGI), le rhamnogalacturonane II (RGII), et les chaînes latérales (Jarvis, 1984). Les études antérieures sur des polysaccharides pariétaux ont permis d'établir que les polysaccharides pectiques sont des macromolécules complexes hétérogènes (Aspinall, 1980). La composition des fractions **PS1** et **PS3** est proche de celle des rhamnogalactane de type I (RG-I).

L'analyse de la composition en monosaccharides (mol %) de la fraction **PS2**, a montré une composition différente comparée à celles de PS1 et PS3. Notons la richesse en xylose (31,8 %), en arabinose (21,6 %) et en galactose (16,9 %). Cette composition en monosaccharides est proche de celle des hémicelluloses. Les hémicelluloses regroupent tous les polysaccharides de la paroi végétale qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques (Chambat *et al.*, 1984). De manière générale, les xylanes constituent la fraction hémicellulosique majeure (20 % massique) des parois cellulaires des monocotylédones et des dicotylédones à l'exception de la paroi primaire des dicotylédones (5%) (Darvill *et al.*, 1980 ; Dey et Brinson, 1984). Ce sont des polysaccharides qui possèdent une chaîne principale de  $\beta$ -D-xylopyranoses liés en (1 $\rightarrow$ 4) substituée par des groupements de nature variable. Les substituants les plus communs sont l' $\alpha$ -L-arabinose lié en position O-3 ou O-2 du xylose (arabinoxylanes) et l'acide  $\alpha$ -D-glucuronique, portant ou non un groupement méthoxyle en position O-4 et/ou O-2 du xylose de la chaîne principale (xylanes acides).

### 3.2. Extraction et composition globale des polysaccharides extraits des graines d'*Astragalus gombo* Bunge

Comme décrit dans la partie synthèse bibliographique, de nombreuses espèces de légumineuses ont été identifiées comme source de polysaccharides et notamment de galactomannanes (exsudats d'Acacia, gommages de guar, caroube, tara, févier, tamarin, fénugrec,...). Ces galactomannanes (GM) sont des réserves utilisables par l'embryon de la plante lors de la germination (Polhill *et al.*, 1981). Ils sont considérés comme des agents bioactifs et comme des hydrocolloïdes (Viebke *et al.*, 2014 ; Jiang *et al.*, 2010 ; Williams et Phillips, 2009). Par conséquent, de nombreuses applications sont aujourd'hui proposées – y compris à l'échelle industrielle pour ces GM.

Dans cette étude, la structure du polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo* a été identifiée par des analyses spectrales en infrarouge (FT-IR), en spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  à haute résolution et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les masses moléculaires moyennes et la distribution des masses moléculaires des polysaccharides ont été déterminées par Chromatographie d'Exclusion Stérique couplée à la diffusion de la lumière multi-Angles (SEC-MALLS).

#### 3.2.1. Composition chimique de la fraction GM

L'extraction aqueuse à 60 °C pendant 2 h d'un broyat de graines d'*Astragalus gombo* suivi d'une précipitation à l'éthanol et une déprotéinisation à l'acide trichloracétique (4 %), a donné une fraction nommée **GM**. Le rendement d'extraction était de  $6,8 \pm 1,5$  % (m/m) par rapport à la matière sèche des graines estimée à  $93 \pm 2$  % après une dessiccation sous vide de 24 h dans un dessiccateur. Ce rendement est plus élevé que celui décrit pour d'autres espèces du genre *Astragalus* tels que *A. cicer* (5,9 %), *A. lehmannianus* (4,8 %), *A. tibetanus* (4,7 %), *A. armatus* (4,2 %), *A. sericeocanus* (3,6 %), *A. danicus* (3,4 %) et *A. alpinus* (0,6 %) (Boual *et al.*, 2015 ; Mestechkina *et al.*, 2000 ; Olennikov et Rokhin, 2008, 2009, 2010, 2011). La fraction GM est principalement composée d'oses neutres ( $85 \pm 2$  % (m/m)), même si des traces de polyphénols ( $1,2 \pm 0,4$  % (m/m)) et des protéines ( $1,0 \pm 0,3$  % (m/m)) ont également été détectées. Ces résultats sont cohérents avec la composition biochimique des autres polysaccharides extraits des graines d'*Astragalus* sp. (Boual *et al.*, 2015 ; Mestechkina *et al.*, 2000 ; Olennikov et Rokhin, 2008, 2009, 2010, 2011). De plus, la teneur totale en sucres de la fraction **GM** (**Tableau 14**) est proche ou supérieure à celles de la gomme de caroube (86 %) et la gomme de guar (70 %) (Dakia *et al.*, 2008 ; Liyanage *et al.*, 2015). La teneur élevée en sucres neutres et la faible quantité de protéines et de polyphénols révèlent l'efficacité du

procédé d'extraction et de purification mise en œuvre dans notre étude.

**Tableau 14: Composition globale des extraits polysaccharidiques des graines d'*Astragalus gombo* Bunge**

	Composition du polysaccharide (m/m %)		
	Oses neutres (% m/m)	Protéines (% m/m)	Composés phénoliques (% m/m)
<b>GM</b>	85 ± 2%	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,4

### 3.2.2. Caractérisation structurale de l'extrait hydrosoluble des graines d'*Astragalus gombo* Bunge

Ces dernières années, de nombreux travaux sur la caractérisation des polysaccharides extraits des graines d'*Astragalus* sp. ont été menés par Olennikov et Rokhin (2008, 2009, 2010, 2011). Néanmoins, aucune investigation n'a été faite sur le polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo* Bunge.

#### 3.2.2.1.1. Composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique (GM) des graines d'*Astragalus gombo* Bunge

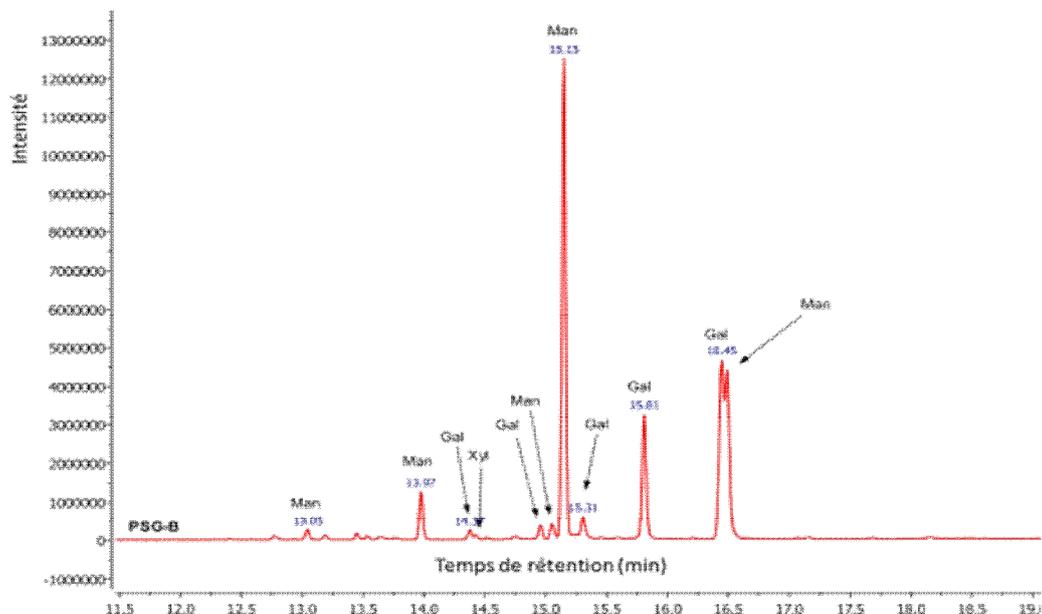
La composition en monosaccharides de la fraction **GM** a été réalisée en utilisant la GC/MS-EI (**Tableau 15**) après hydrolyse acide au TFA (2 M) à 120 °C pendant 90 min et dérivatisation des monosaccharides sous forme de dérivés triméthylsilylés selon la méthode de kamerling *et al.*, (2007) modifiée par Montreuil *et al.* (1986) (**Figure 56**).

**Tableau 15: Analyse par CG/SM-EI de la composition en monosaccharide (% molaire) des polysaccharides extrait des graines d'*Astragalus gombo* Bunge.**

Extrait	Monosaccharides (mol%) <sup>a</sup>		
	Gal	Man	Man <sub>p</sub> /Gal <sub>p</sub>
<b>GM</b>	37±0,9	63±0,7	1,7

Comme indiqué dans le **Tableau 15**, la fraction **GM** est exclusivement composée de deux monosaccharides : le mannose (63 ± 0,7 % mol) et le galactose (37 ± 0,9 % mol). La forme pyranose des résidus galactose et mannose a été confirmée par l'abondance du rapport (m/z : 204/217) comme décrit par Harris *et al.* (1984). Par conséquent, a ce stade de l'étude, la fraction GM a été identifiée comme un galactomannane ayant un rapport Man<sub>p</sub>/Gal<sub>p</sub> égal à 1,7 (**Tableau 15**). Ces résultats sont en accord avec les recherches précédentes sur les

polysaccharides extraits de graines d'autres espèces du genre *Astragalus* qui ont été identifiés comme des GM avec des rapports  $\text{Man}_p/\text{Gal}_p$  de respectivement 1,1 ; 1,2 ; 1,3 ; 1,4 ; 1,4 ; 1,5 et 1,6 pour *A. armatus*, *A. lehmannianus*, *A. tibetanus*, *A. alpinus*, *A. Cicer*, *A.* et *A. danicus* et *A. sericeocanus* (Boual *et al.*, 2015; Mestechkina *et al.*, 2000; Olennikov et Rokhin, 2008, 2009, 2010, 2011). La pureté des GM et le rapport  $\text{Man}_p/\text{Gal}_p$  apparait comme assez variable chez les graines de Fabaceae selon l'origine végétale et les procédés d'extraction (Kodiralieva et Rakhmanberdyeva 2011 ; Muschin et Yoshida, 2012, Srivastava et Kapoor, 2005).

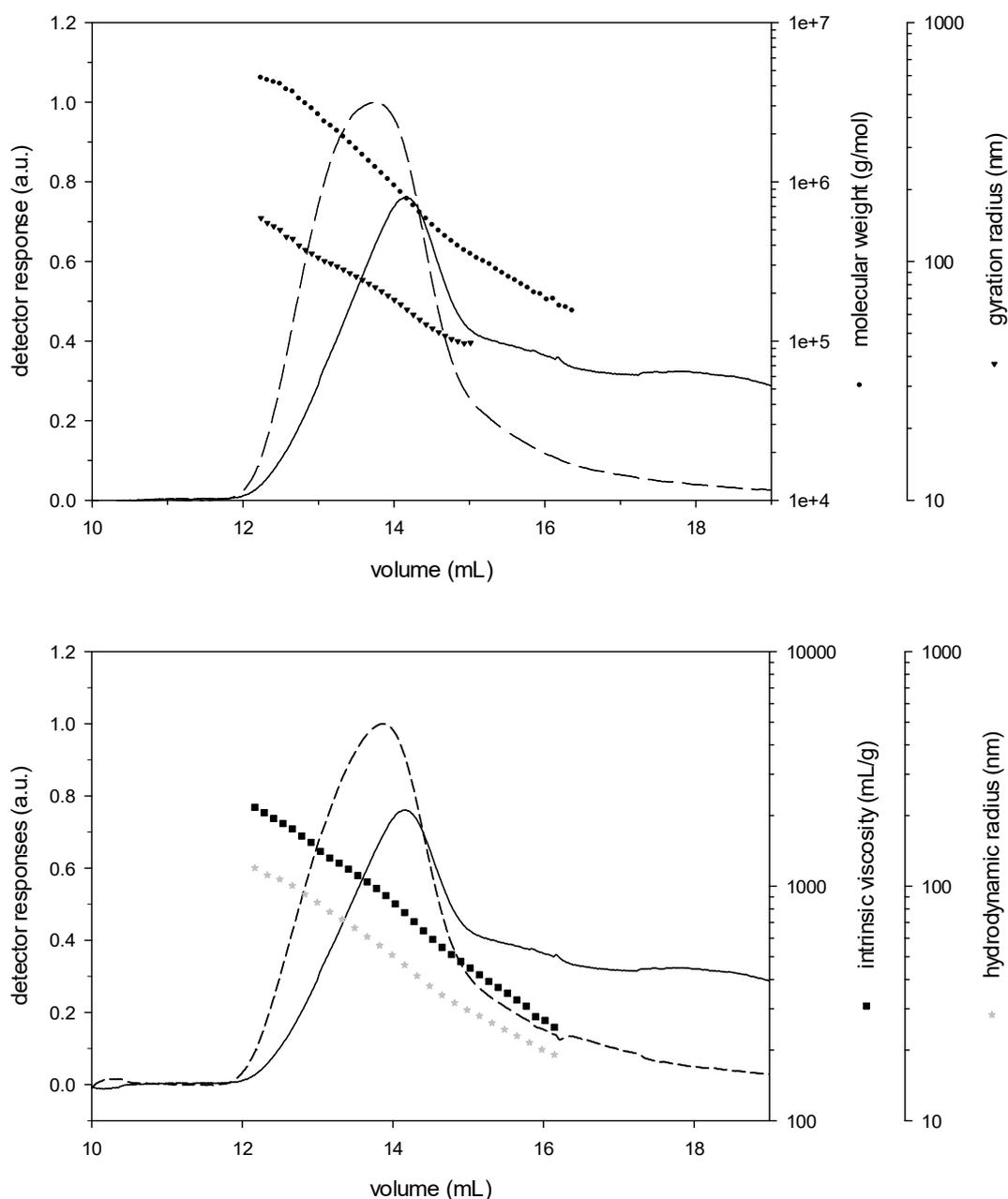


**Figure 56: Chromatogramme du polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo* Bunge, hydrolysé au TFA (2 M), triméthylsilylé et analysé par CG/SM-EI. Avec Gal : Galactose ; Man : Mannose.**

### 3.2.2.2. Détermination de la masse moléculaire de la fraction GM

La masse moléculaire, la distribution et de la structure moléculaire affectent les caractéristiques rhéologiques et fonctionnelles des polysaccharides et notamment des GM (Albuquerque *et al.*, 2014 ; Hatakeyama *et al.*, 2004 ; Tanaka, *et al.*, 2004).

Les masses moléculaires en poids ( $M_w$ ), les masses moléculaires moyennes en nombres ( $M_n$ ) et la viscosité intrinsèque du GM extrait des graines d'*Astragalus gombo* ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique à haute performance équipée d'un détecteur de diffusion de lumière multi-angles couplé à un réfractomètre différentiel et à un viscosimètre en ligne (**Figure 57**). Le taux de récupération de l'échantillon a été estimé à 90 %. Comme observé dans la **Figure 57**, on constate une faible polydispersité de l'échantillon, puisque le signal réfractométrique s'étale seulement sur un volume de 4 mL.



**Figure 57: Evolution de (A) la masse moléculaire et (B) de la viscosité intrinsèque du polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo* Bunge. Les analyses sont effectuées sur l'ensemble du volume d'éluion (de 12 à 18 mL). Avec dRI : détection réfractométrique.**

Les valeurs des masses moléculaires moyennes et du rayon de giration déterminées sont rapportées dans le **Tableau 16**. Les valeurs de la masse moléculaire moyennes en poids et en nombre (Da) ont été estimées à  $11 \times 10^5$  et  $7 \times 10^5$  Da indiquant une faible polydispersité ( $I_p = 1,57$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux compris entre  $4,7 \times 10^5$  et  $1,6 \times 10^6$  Da décrits pour les autres GM de graines d'*Astragalus* sp. (Boual *et al.*, 2015 ; Mestechkina *et al.*, 2000 ; Olennikov et Rokhin, 2008 ; 2009 ; 2010 ; 2011).

**Tableau 16: Caractérisation du GM extrait des graines d'*Astragalus gombo***

	Mn (Da) <sup>a</sup>	Mw (Da) <sup>b</sup>	Ip <sup>c</sup> (Mw/ Mn)	R <sub>g</sub> (z) (nm) <sup>d</sup>	R <sub>h</sub> (w) (nm) <sup>e</sup>	ρ (Rg/Rh)	[η] (mL/g) <sup>f</sup>
<b>GM</b>	7.0x10 <sup>5</sup>	11,0x 10 <sup>5</sup>	1,57	91	52	1,75	860

<sup>a</sup> Mn: Masse moléculaire moyenne estimée par SEC-MALLS; <sup>b</sup> Mw: masse moléculaire estimée par la SEC-MALLS; <sup>c</sup> Ip: indice de polydispersité estimée par SEC- MALLS; <sup>d</sup> R<sub>g</sub>: rayon de giration estimée par SEC MALLS; <sup>e</sup> R<sub>h</sub>: rayon hydrodynamique estimée par SEC-MALLS; <sup>f</sup> [η]: viscosité intrinsèque. Toutes les analyses ont été effectuées en triple exemplaire et les écarts types relatifs sont inférieurs à 5%.

Comparativement à d'autres GM issus des graines d'*Astragalus* sp, l'Ip de 1,57 est proche de celui du GM des graines d'*Astragalus armatus* (Boual *et al.*, 2015). La viscosité intrinsèque indiquant le volume hydrodynamique occupé par les macromolécules dans une solution diluée a été estimée pour le **GM** d'*A. gombo* à 860 mL/ g. Cette valeur est inférieure aux valeurs [η] de la gomme de guar (1100-1130 mL/g) mais elle est proche de celles d'autres valeurs de viscosité intrinsèque de GM extraits des graines du genre *Astragalus* sp. variant de 471 à 1337 mL/g (Mestechkina *et al.*, 2000 ; Olennikov et Rokhin, 2008, 2009, 2010, 2011). Ces différences sont liés à l'origine des plantes et aux procédés d'extraction/purification utilisés qui influent la masse moléculaire et la viscosité intrinsèque.

Le rayon hydrodynamique (Rh) et le rayon de giration (Rg) sont des paramètres caractéristiques liés à la conformation des polysaccharides en solution. Ils ont été évalués respectivement à 52 et 91 nm pour le GM (**Tableau 16**). Le facteur de structure (ou facteur de forme) ρ (ρ = Rg/Rh) peut être utilisé pour décrire la conformation du polysaccharide en solution (conformation sphérique compacte (ρ = 0,77), chaînes linéaires flexibles (ρ > 0,82), bâtonnets (ρ > 2) (Burchard, Schmidt et Stockmayer, 1980). Le facteur de forme ρ augmente dès que la macromolécule dévie d'une forme de type sphérique vers une forme de type pelote et finalement vers une forme de type bâtonnet. Le **GM** extrait des graines d'*A.gombo* a une valeur de ρ de 1,75 correspondant à une conformation de type pelote aléatoire à structure ramifiée (Burchard *et al.*, 1980).

### 3.2.2.3. Analyse des liaisons glycosidiques du GM extrait des graines d'*A. gombo*

Les liaisons glycosidiques présentes dans la structure du polysaccharide extrait des graines d'*A. gombo* (**GM**) ont été déterminées par analyse CG/SM après transformation des monosaccharides méthylés issus d'une hydrolyse acide du GM préalablement méthylé en acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM) (Peña *et al.*, 2012). Les AAPM obtenus sont présentés dans le **Tableau 17**.

**Tableau 17: Identification des acétates d'alditols partiellement O-méthylés (AAPM) et des liaisons glycosidiques correspondantes issus du GM extrait de graines d'*Astragalus gombo*.**

Acétates d'Alditols partiellement O-méthylés <sup>(a)</sup>	% <sup>(b)</sup>	Type de liaison <sup>(c)</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	22,0	Gal <sub>p</sub> -(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	5,0	→4)-Gal <sub>p</sub> -(1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	Traces	Man <sub>p</sub> -(1→
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	52,0	→4)-Man <sub>p</sub> -(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Man	21,0	→4,6)-Man <sub>p</sub> -(1→

Les analyses ont été effectuées en double exemplaire et les écarts types relatifs sont inférieurs à 5%.

(a) 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Gal=2,3,6-tri-O-méthyl-galactitol-acétate, etc.

(b) % de l'air de pic d'acétates O-méthylalditol par rapport à la surface totale, déterminée par GC-MS.

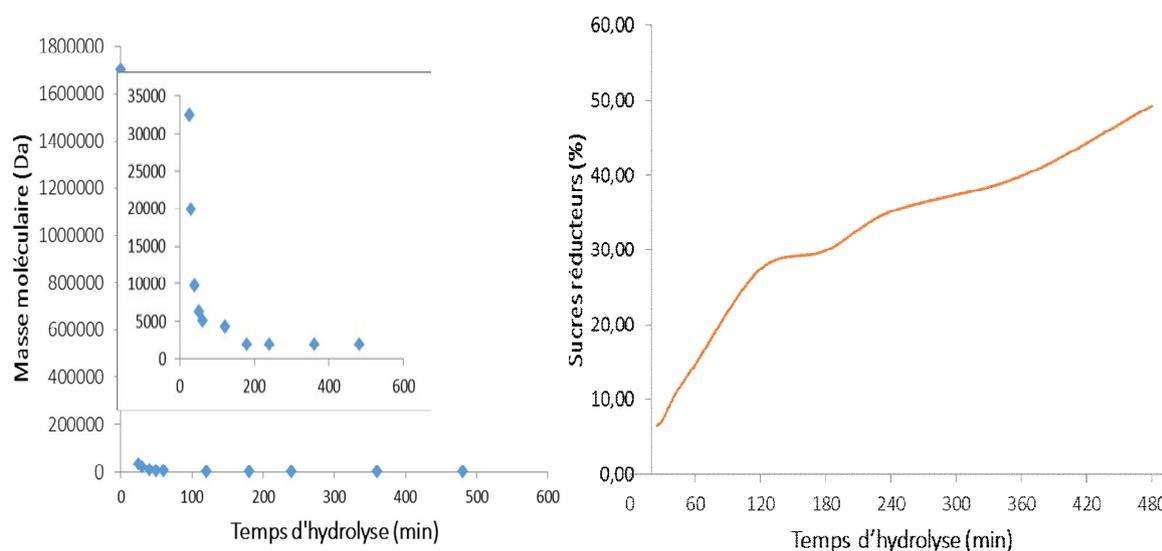
(c) Basé sur les dérivés d'acétates O-méthylalditol.

Comme indiqué dans le **Tableau 17**, la méthylation du GM a permis d'identifier la présence d'une majorité de dérivés méthylés de type 2,3,6-tri-O-méthyl-mannitol-acétate (2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man), qui représentent 52,0 % de la quantité totale de dérivés méthylés. Ce résultat indique clairement que nous sommes en présence d'un mannane de type [ $\rightarrow$ 4)-Man<sub>p</sub>-(1 $\rightarrow$ )]<sub>n</sub>. Les 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactitol-acétate (2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal) détectés à hauteur de 22,0 % (sur la base de la quantité totale de dérivés méthylés) ont été attribués à des ramifications terminales non réductrices de la chaîne principale de type [Gal<sub>p</sub>-(1 $\rightarrow$ )]. Les 21,0 % de 2,3-di-O-méthyl-mannitol-acétate (2,3-Me<sub>2</sub>-Man) confirment que le résidu galactose terminal non réducteur est principalement ramifié en position 6 du squelette  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannane. De plus, les 5,0 % de 2,3,6-tri-O-méthyl-galactitol-acétate (2,3,6-Me<sub>3</sub>-Gal) révèlent la présence d'une courte chaîne de type ([ $\rightarrow$ 4)-Gal<sub>p</sub>-(1 $\rightarrow$ )]<sub>n</sub>. Ces liaisons glycosidiques confirment la nature GM du polysaccharide extrait de graines d'*Astragalus gombo*. Dans la littérature traitant des galactomannanes du genre *Astragalus*, il a été mentionné que ces polysaccharides sont composés d'unités de mannopyranosyl liées en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) et substituées en position O-6 par des résidus  $\alpha$ -galactopyranose (Olennikov et Rokhin, 2008, 2009, 2010, 2011).

#### 3.2.2.4. Étude de la dégradation par voie chimique du polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo bunge*

Les polysaccharides natifs sont généralement moins actifs lors des tests biologiques que les oligosaccharides issus de leur dégradation (Roger *et al.*, 2002). Par ailleurs Il est plus difficile d'étudier la structure de polysaccharides de hautes masses molaires que d'oligosaccharides. Par conséquent, afin d'augmenter la solubilité due GM pour réaliser des analyses en spectroscopie RMN <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C et pour augmenter son potentiel comme actif biologique, une

hydrolyse acide partielle à l'acide sulfurique (20 % v/v) a été réalisée pendant 30 minutes à 50 °C en suivant le protocole décrit par Muschin et Yoshida (2012). La fraction obtenue a été nommée GMHD. L'évolution des distributions de masses moléculaires des hydrolysats a été contrôlée par chromatographie d'exclusion stérique. L'étalonnage de la colonne a été réalisé à l'aide de dextrans standards et un suivi de l'hydrolyse a été effectué par un dosage colorimétrique des sucres réducteurs (Figure 58).

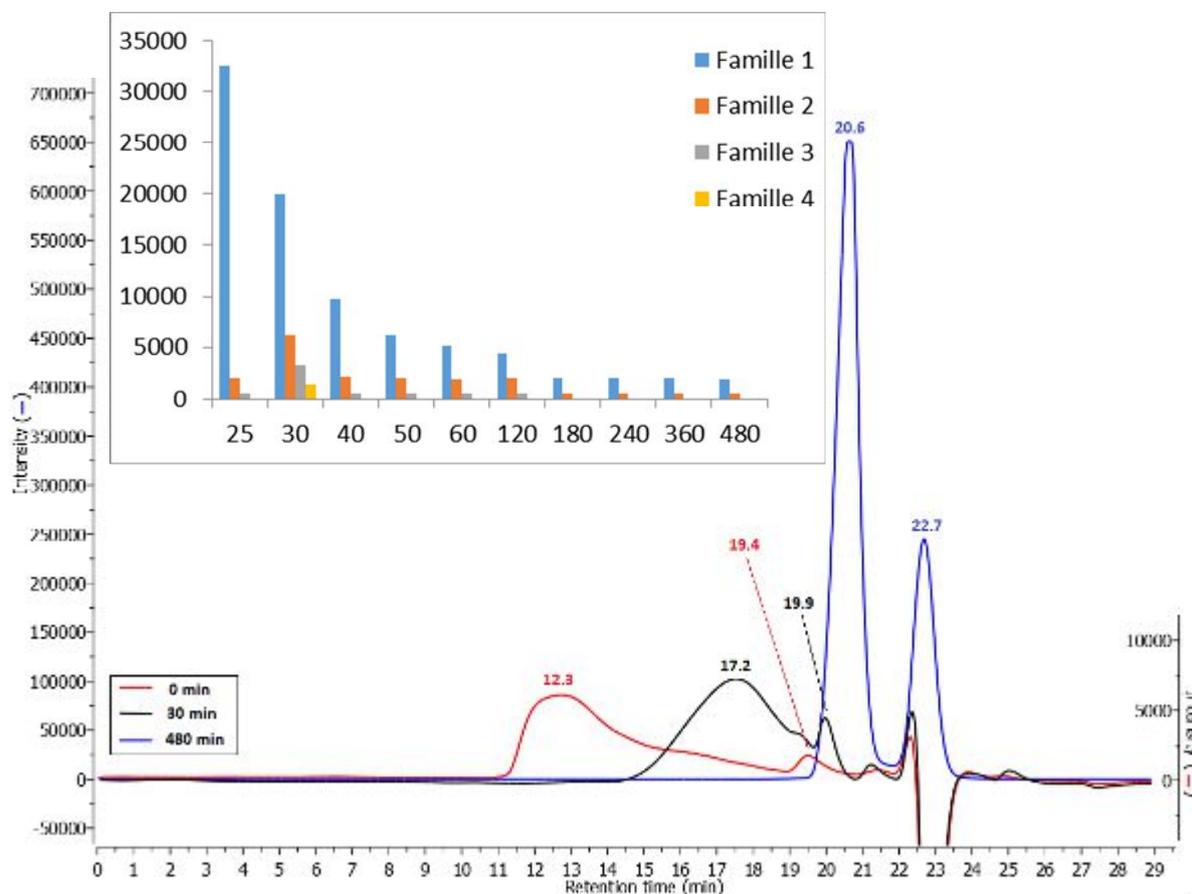


**Figure 58: Cinétique d'hydrolyse acide du GM extrait des graines d'*Astragalus gombo* réalisée à la concentration de 10 g/L dans 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 % v/v) pendant 8h à 50 °C.**

**Tableau 18: Evolution des masses moléculaires (Da) lors de l'hydrolyse acide des polysaccharides des graines suivies par chromatographie d'exclusion stérique**

Temps d'hydrolyse (min)	Masse moléculaire (Da)			
	Famille 1	Famille 2	Famille 3	Famille 4
0	1704250			
25	32545	2047	533	
30	19929	6334	3283	1402
40	9778	2175	533	
50	6316	2003	532	
60	5124	1874	528	
120	4394	2077	531	
180	2005	531		
240	2011	527		
360	2063	523		
480	1971	530		

La **Figure 59** résume l'évolution des masses moléculaires des différentes familles constitutives du GM d'*Astragalus gombo* lors de son hydrolyse acide. L'hydrolyse acide génère la formation de polysaccharides de faible masse moléculaire et d'oligosaccharides de masse moléculaire moyenne de l'ordre de 530 Da après 8 heures d'hydrolyse (**Tableau 18**).



**Figure 59: Evolution des masses moléculaires des différentes familles constitutives du galactomannane d'*Astragalus gombo* lors de son hydrolyse acide.**

Comme observé dans le **Tableau 18** et sur la **Figure 59**, cette analyse permet également de classer selon leurs masses moléculaires, les polysaccharides et oligosaccharides soumis à différents temps d'hydrolyse (de 0 à 480 min) en quatre familles dont les tailles ont été estimées entre  $1,7 \times 10^6$  Da pour le polysaccharide natif, 32,5 kDa et 19,9 kDa après 25 min et 30 min d'hydrolyse respectivement. Nous avons donc choisi cette fraction d'environ 20 kDa pour l'analyse en RMN et pour les tests d'activités biologiques.

### 3.2.2.5. L'analyse par spectroscopie $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ RMN de polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo*

Le GM extrait des graines d'*A. gombo* a été analysé par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  après hydrolyse acide partielle (fraction GMHD).

Comme observé sur les **Figure 60** et **61**, les analyses 1D-RMN et 2D-RMN ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC) de la fraction **GMHD** ont révélées des signaux spécifiques caractéristiques des GM (Albuquerque *et al.*, 2014 ; Muschin et Yoshida, 2012). En effet, dans le spectre  $^1\text{H}$ -RMN (**Figure 60A**), deux signaux distincts de monosaccharides ont été identifiés dans la région des protons anomériques. Ces signaux à 5,21 ppm et à 4,94 ppm ont été attribués au proton H-1 de l' $\alpha$ -D-galactopyranose (**G1**) et de l' $\beta$ -D-mannopyranose (**M1**), respectivement. Le rapport de Manp/Galp a été estimé à 1,63 dans les zones relatives des signaux **G1** et **M1**. Cette valeur est proche du résultat obtenu avec l'analyse GC-MS (Manp/Galp = 1,7). Comme représenté sur la **Figure 60B**, le spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN a révélé des signaux bien résolus dans la région anomérique, correspondant à l'extrémité C-1 d'un  $\beta$ -D-mannopyranose non ramifié à 100,34 ppm (**M1**). Le C-1 d'un  $\beta$ -D-mannopyranose ramifié en position O-6 est identifié à 100,47 ppm (**M1'**), et le C-1 d'un  $\alpha$ -D-galactopyranose est identifié à 99,10 ppm (**G1**). De plus, la région de 60-67 ppm donne des informations importantes sur la structure en raison des signaux spécifiques observés à 60,86 ppm, 61,52 ppm et 66.83 ppm attribués respectivement au C-6 d'un  $\beta$ -D-mannopyranose non ramifié (**M6**), au C-6 d'un  $\alpha$ -D-galactopyranose (**G6**) et au C-6 d'un  $\beta$ -D-mannopyranose ramifié en position O-6 (**M6'**) (Albuquerque *et al.*, 2014; Muschin et Yoshida, 2012).

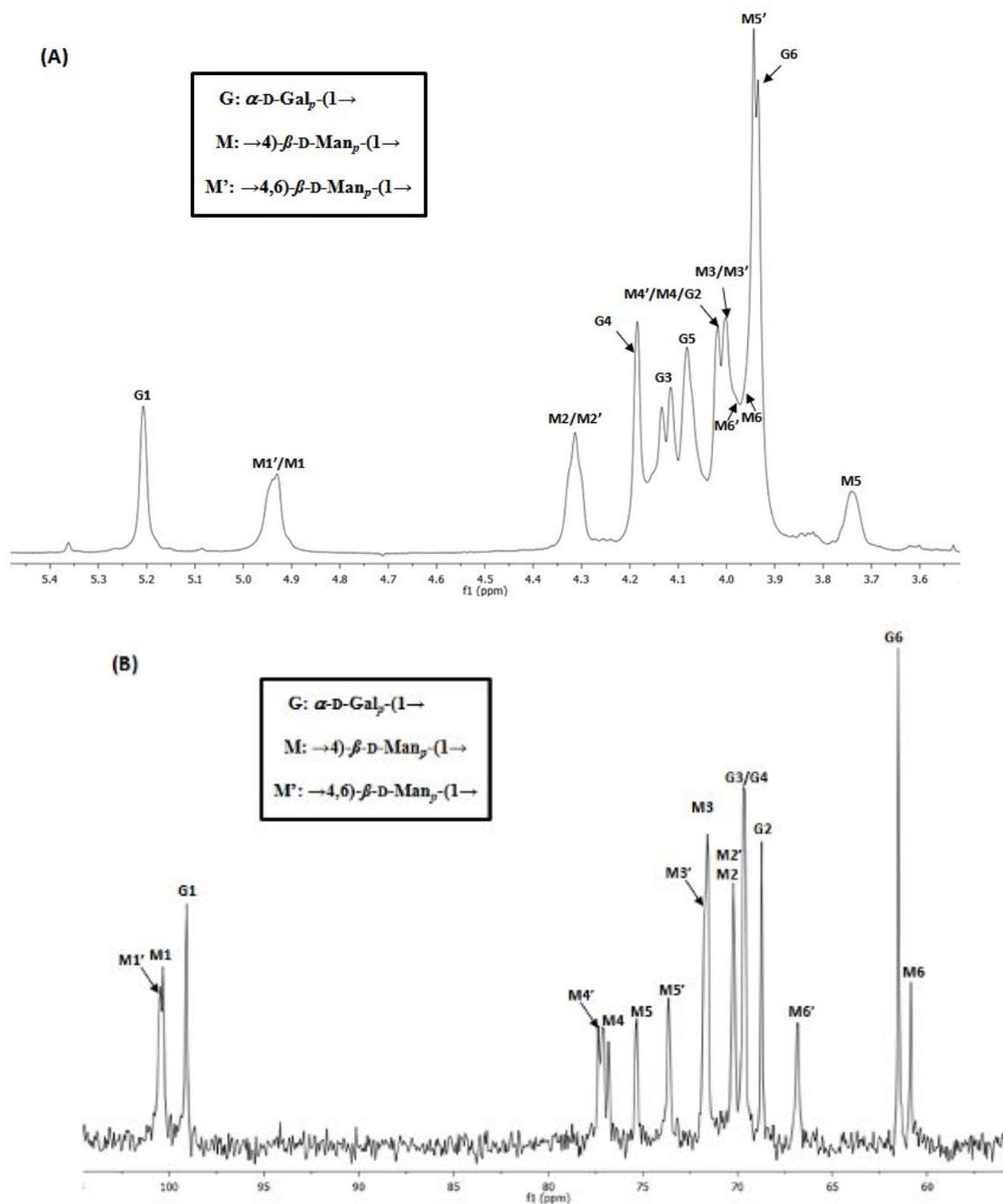


Figure 60: Spectres RMN (A)  $^1\text{H}$  et (B)  $^{13}\text{C}$  de la fraction GMHD à 100 g/L dans le  $\text{D}_2\text{O}$ . M et G se rapportent respectivement aux unités mannose et galactose

Finalement, le spectre  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC (Figure 62) présente la corrélation et les assignations complètes des  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du GM extrait des graines d'*A. gombo* (Tableau 19).

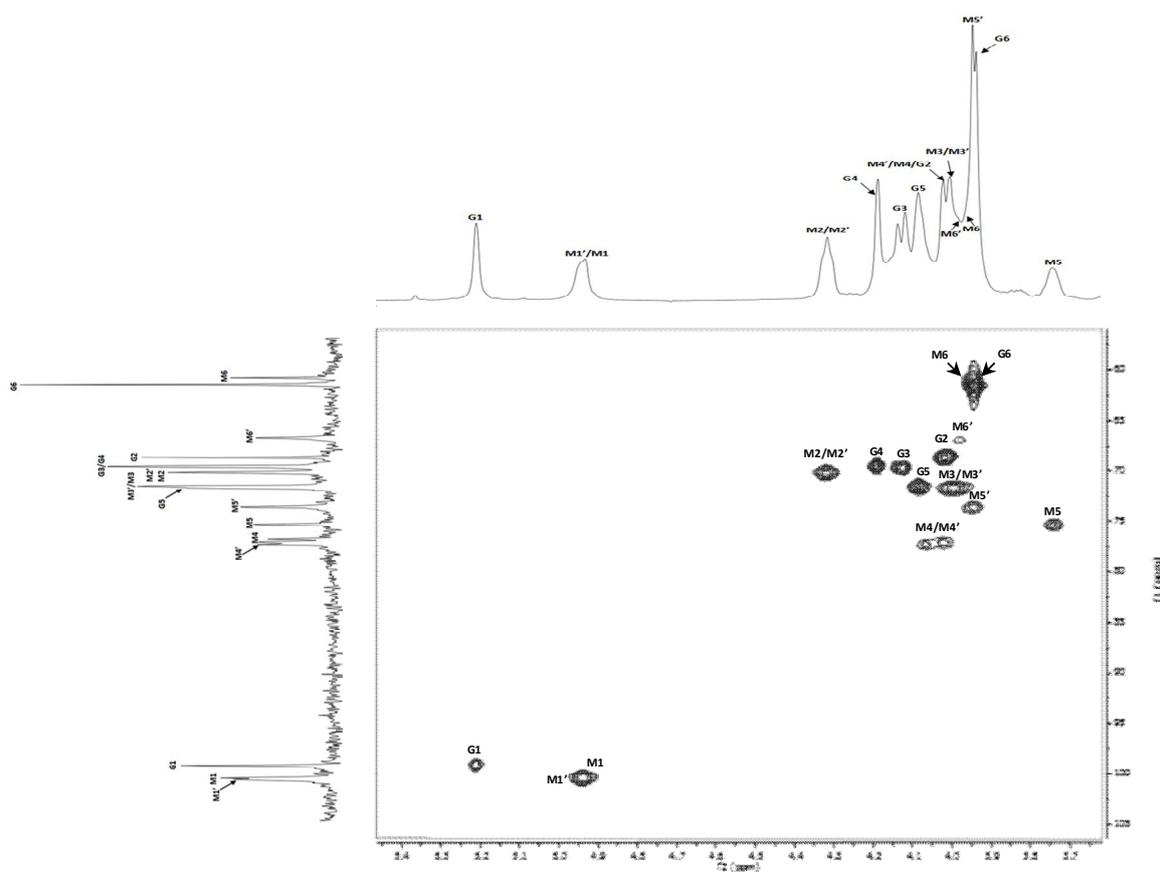
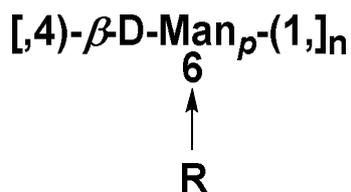


Figure 61: Spectre  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC de la fraction GMHD à 100 g/L dans le  $\text{D}_2\text{O}$ . M et G se rapportent respectivement aux unités mannose et galactose.

Tableau 19: Déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (ppm) du GM extrait des graines d'*A. gombo*.

Structure	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
G: $\alpha\text{-D-Gal}_p\text{-(1}\rightarrow$	99,10/5,21	68,73/4,01	69,71/4,13	69,66/4,19	71,77/4,08	61,52/3,94
M: $\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Man}_p\text{-(1}\rightarrow$	100,34/4,93	70,22/4,31	71,59/4,0	77,11/4,02	75,34/3,74	60,86/3,97
M': $\rightarrow\text{4,6)-}\beta\text{-D-Man}_p\text{-(1}\rightarrow$	100,47/4,95	70,23/4,32	71,59/4,0	77,35/4,03	73,66/3,95	66,83/3,98

En conclusion de ces analyses RMN ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ), nous confirmons que le polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo* est constitué d'une chaîne principale de mannane de type  $\beta\text{-(1,4)-D-Man}_p$  substituée en position O-6 par des unités de  $\alpha\text{-D-galactopyranosyle}$ . Ces résultats sont conformes avec les données de la littérature concernant les polysaccharides de ce type de graines (Albuquerque *et al.*, 2014 ; Muschin et Yoshida, 2012). Au regard des connaissances acquises sur les GM, nous pouvons donc proposer la structure suivante pour ce galactomannane extrait des graines d'*Astragalus gombo* (Figure 62).



**Figure 62:** Structure proposée pour le polysaccharide extrait des graines d'*Astragalus gombo*. Avec R pouvant être l'un des groupements suivants : H ou T- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$  ou T- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$  [4)- $\alpha$ -D-Galp-(1)n-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ).

### 3.3. Etudes rhéologique du GM extrait des graines d'*Astragalus gombo* Bunge.

Cette partie a comme objectif principal de caractériser les propriétés rhéologiques des solutions de GM extrait des graines d'*Astragalus gombo*.

#### 3.3.1. Etudes des propriétés d'écoulement des solutions de GM

Les mesures des propriétés d'écoulement des solutions de GM (de 0,5 à 4 % (m/v)) extrait des graines d'*Astragalus gombo* ont été réalisées à 25 °C en régime semi-dilué. Comme le montre la **Figure 63**, les courbes d'écoulement sont typiques d'un comportement non newtonien, la viscosité étant dépendante du taux de cisaillement (**Figure 63A**) ou de sa contrainte (**Figure 63B**) et ceci quel que soit la concentration testée à l'exception des faibles concentrations où ce comportement est moins marqué. Ce comportement est dit rhéofluidifiant ou pseudoplastique et s'explique par le fait que les macromolécules s'orientent dans la direction du flux sous l'effet du cisaillement (Hussain *et al.*, 2015). Cette réorganisation des molécules se traduit par une diminution de la viscosité (Brummer *et al.*, 2003 ; Sittikijyothin *et al.*, 2005, Mao *et al.*, 2006). La viscosité apparente est quasiment constante dans la région des faibles taux de cisaillement. Cette région est qualifiée de plateau Newtonien. Ce pallier est suivi d'une chute de viscosité apparente dans les régions de plus hautes vitesses de cisaillement (**Figure 63A**).

Plusieurs paramètres influencent la viscosité dynamique  $\eta$  des solutions semi diluées. L'augmentation de la concentration d'une solution accroîtra la viscosité initiale du liquide, comme elle accentue également le caractère rhéofluidifiant de la solution. Outre l'effet de la concentration, la viscosité apparente d'une solution semi-diluée reste liée à la structure moléculaire qui influence les possibilités d'interaction. Ces phénomènes contribuent fortement au développement de la viscosité et expliquent la forte dépendance de la viscosité à la concentration (Doublie *et al.*, 1981 ; Morris *et al.*, 1981 ; Ganter *et al.*, 1992 ; Kapoor *et al.*, 1994, 1998 ; Rinaudo, 2001 ; Secouard *et al.*, 2007).

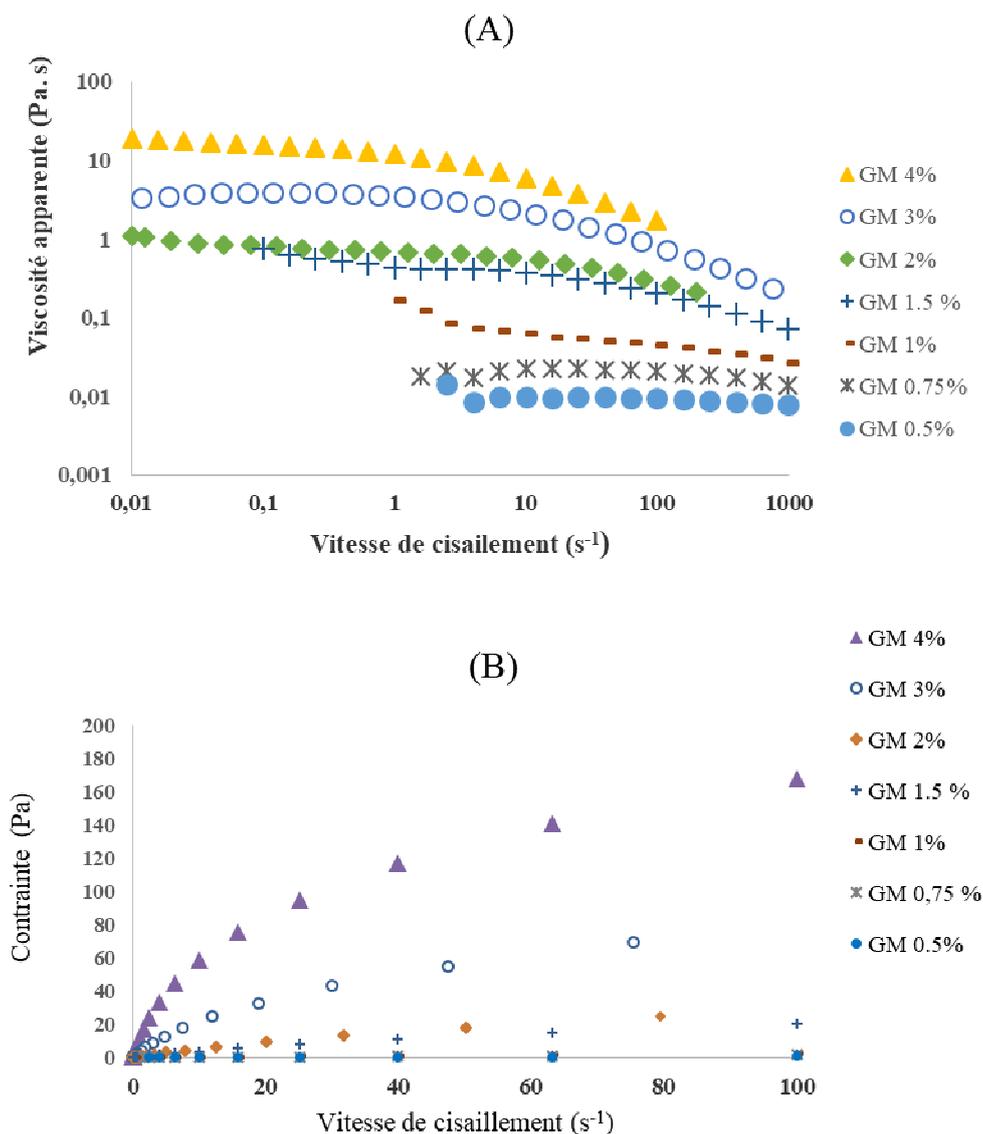
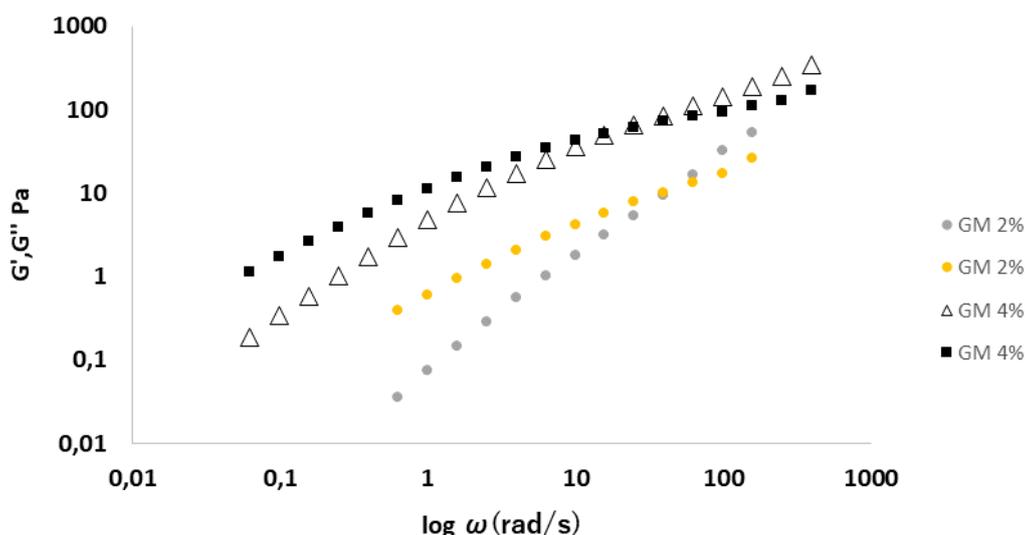


Figure 63: Influence du taux de cisaillement et de la concentration en GM sur (A) la viscosité et (B) la contrainte de cisaillement.

### 3.3.2 Etudes des propriétés du GM en mode oscillatoire.

En vue de compléter les analyses rhéologiques précédentes, des mesures en mode oscillatoire ont été réalisées sur des solutions de GM comprises entre 2 et 4 % (m/v) afin de déterminer leur viscoélasticité et d'apporter des informations sur la dynamique du système. Les courbes de variation des modules viscoélastiques, à savoir  $G'$  (module de conservation ou module élastique (Pa)) et  $G''$  (module de perte ou module visqueux (Pa)) en fonction de la déformation pour des fréquences angulaires de 0,1 à 1000  $rad.s^{-1}$  (ou de la pulsation) sont présentées en **Figure 64**. Pour toutes les concentrations de GM, les valeurs de  $G'$  et  $G''$  augmentent lorsque la fréquence augmente. En outre, on peut observer que les solutions de GM (2 et 4 % (m/v)) sont typiques d'un fluide viscoélastique puisque le module visqueux  $G''$

(Pa) est supérieur au module élastique  $G'$  (Pa) pour des fréquences d'oscillation faibles alors que pour des fréquences plus élevées, l'inverse est observé. Ce comportement, au départ, est plus proche de celui d'un liquide visqueux car les enchevêtrements ont suffisamment de temps pour se dissocier et se reformer. Avec l'augmentation de la fréquence, donc la diminution du temps d'observation, le module élastique  $G'$  est dominant, le produit a un comportement plus proche de celui d'un solide élastique car les enchevêtrements n'ont plus le temps de se défaire. Ce résultat a déjà été décrit pour plusieurs GM (Hussain *et al.*, 2015).



**Figure 64:** Représentation des modules complexes  $G'$  et  $G''$  en fonction de la déformation des solutions aqueuses de GM à 4 et 2 % (m/v) extraits de graines d'*Astragalus gombo* et à 25 °C.

L'augmentation de la concentration de la solution à générer la transition d'un comportement plus visqueux vers un comportement plus élastique (Lazaridou *et al.*, 2000) et donc, un déplacement du point d'intersection vers des fréquences plus basses. Ce comportement est observé avec d'autres GM et notamment avec la gomme de caroube (Gillet *et al.*, 2014). Cette observation est logique car l'augmentation de la concentration favorise l'apparition d'un réseau interpénétré et enchevêtré, difficile à dissocier, et donc au comportement élastique (Agemura *et al.*, 1995).

#### 3.3.3. Concentration critique de recouvrement $C^*$

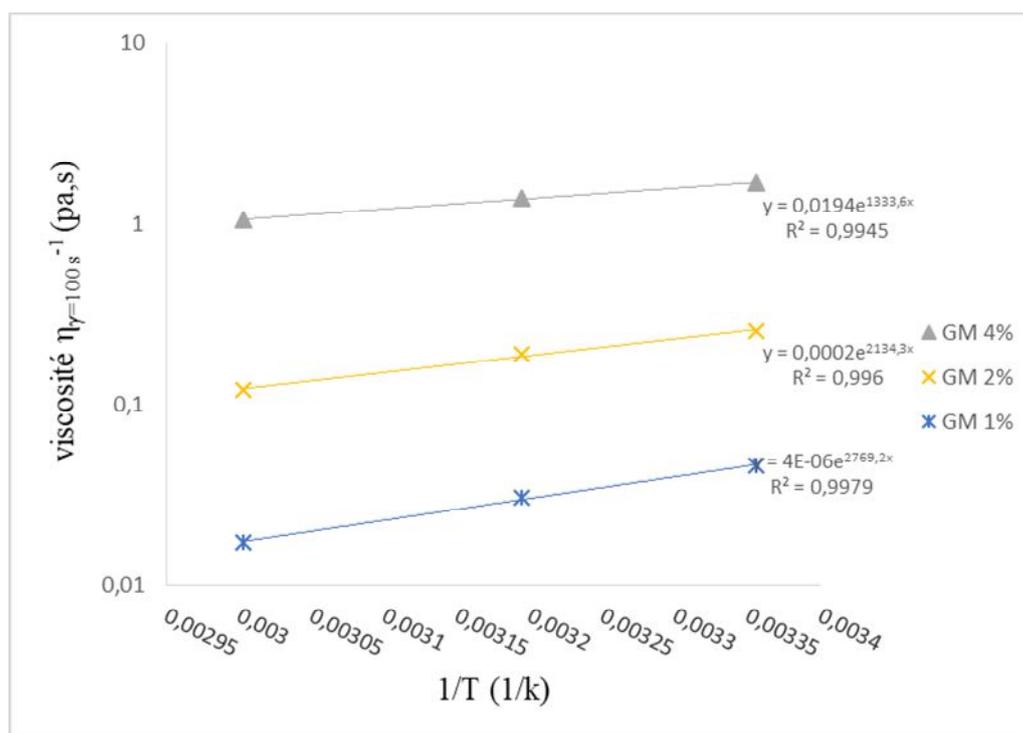
La concentration critique de recouvrement ( $C^*$ ) représente la limite entre les régimes dilué et semi-dilué c'est-à-dire la limite entre des solutions de concentrations telles que toutes les macromolécules sont indépendantes les unes des autres et celles au-delà de laquelle les

enchevêtrements entre macromolécules commencent à se créer (Lapasin et Pricl, 1999). La concentration  $C^*$  peut être obtenue expérimentalement en traçant en échelle logarithmique l'évolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration. La détermination de la viscosité intrinsèque réalisée au paragraphe 3.2.2.2. permet également d'estimer la  $C^*$  (Graessley, 1974 ; Axelos *et al.*, 1989). En fonction de la nature des polysaccharides étudiés les auteurs donnent des coefficients différents dans la relation entre le  $C^*$  et  $[\eta]$  tels que  $C^* = (0,77 \text{ à } 4)/[\eta]$  (Graessley, 1974 ; Morris, Rees, Robinson et Young, 1980, Lapasin et Pricl, 1999 ; Doublier et Launay, 1981). A noter que plus la masse moléculaire des polysaccharides est élevée plus la concentration critique de recouvrement est faible (Redgwell *et al.*, 2005).

Avec une  $[\eta]$  de 860 mL/g, la valeur de  $C^*$  déterminée pour le GM d'*A. gombo* est comprise entre 0,09 et 0,47 % (m/v). Cette valeur est comparable à celles d'autres GM décrits dans la littérature (Doublier et Launay, 1981 ; Morris *et al.*, 1980). En conclusion les solutions de GM provenant des graines d'*Astragalus gombo* présente un comportement pseudoplastique comme la plupart des GM décrits dans la littérature.

#### 3.3.4. Effet de la température et de la concentration en GM sur la viscosité.

L'influence de la température (de 25 à 60 °C) sur la viscosité des solutions de GM d'*A. gombo* pour des concentrations de 1 à 4 % a été évalué. Comme c'est le cas avec la majorité des solutions de polysaccharide, la viscosité diminue proportionnellement avec l'élévation de la température. Ce comportement est indépendant de la concentration dans la gamme de concentrations testées entre de 1 à 4% et à un taux de cisaillement  $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$  (Figure 65). Cette diminution peut être liée à la transition de la solution d'un équilibre à un autre, à la dégradation des polysaccharides ou au changement de conformation des polysaccharides en solution (De Paula et Rodrigues, 1995).



**Figure 65: Effet de la température et sur la viscosité des solutions de GM d'*A. gombo* à des concentrations comprises entre 1 et 4% (m/v).**

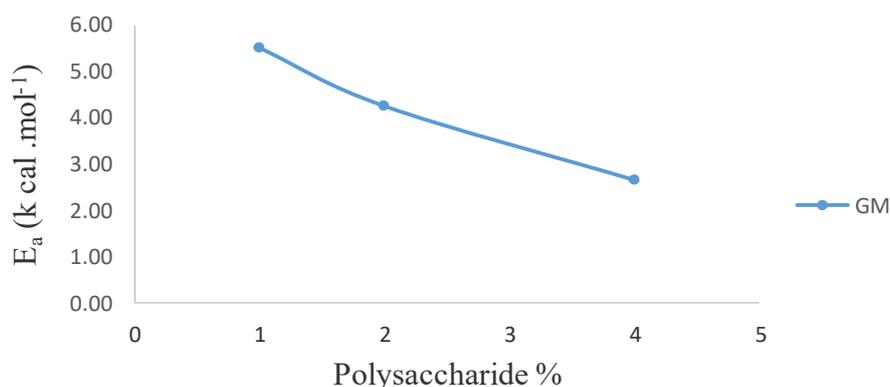
La dépendance de la viscosité à la température peut être représentée par une équation de type Arrhenius :  $\eta = A \exp \left[ \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} \right) \right]$ . Dans cette équation,  $E_a$  est l'énergie d'activation,  $R$  est la constante des gaz parfaits égale à  $8,314 \text{ J.K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ;  $A$  est un facteur de fréquence et  $T$  est la température en Kelvin. L'écoulement d'un liquide visqueux est décrit comme le franchissement d'une barrière énergétique par une unité moléculaire de ce liquide. Cette transition est accélérée par l'élévation de la température de la solution ; raison pour laquelle Andrade (1930), Eyring (1935) et Lewis (1987) expriment la viscosité comme une fonction de la température. Dans ce contexte, pour une concentration donnée en polysaccharide, une faible énergie d'activation d'écoulement indique de faibles interactions intra et interchaînes. A contrario, une énergie d'activation  $E_a$  élevée est synonyme de fortes interactions intra- et interchaines comme cela est observé avec la plupart des polysaccharides non ou peu ramifiés. A la concentration 4 % le **GM** d'*A. gombo* présente une énergie d'activation de  $2,65 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , plus faible que celles enregistrées pour les concentrations 1 et 2 %, soit ;  $E_a = 5,51 \text{ kcal.mol}^{-1}$  et  $4,24 \text{ kcal.mol}^{-1}$  respectivement (**Tableau 20**). Cet effet inversement proportionnel de l'énergie d'activation par rapport à la concentration montre que la solution de GM à 4 % est la moins sensible au changement de la température de 25 à 60 °C. L'allure linéaire des courbes obtenues en appliquant l'équation d'Arrhénius-Frenkel-Eyring (Vinogradov et Melkin, 1980)

citée par De Paula *et al.* (2001) confirme l'absence de transition conformationnelle des polysaccharides sous l'effet de la température.

**Tableau 20: Calcul des énergies d'activation du GM d'*A. gombo* (4 ; 2 et 1%) et de guar (2 et 1%) pour des températures comprises entre 25°C à 60°C et à un taux de cisaillement fixe de  $\dot{\gamma}=100$  s<sup>-1</sup>.**

Echantillon	$E_a/R$	$E_a$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )
GM 4 %	1333,6	2,65
GM 2 %	2134,3	4,24
GM 1 %	2769,2	5,51

La **Figure 66** résume l'évolution d' $E_a$  en fonction de la concentration



**Figure 66: Effet de la concentration sur l'énergie d'activation**

### 3.3.5. Effet couplé de la température et de la vitesse de cisaillement sur la viscosité.

Les résultats de l'effet de la température sur la viscosité à différents taux de cisaillements ( $\dot{\gamma}=0,1$  à  $100$  s<sup>-1</sup>) sont présentés sur la **Figure 67**. Ils montrent un léger effet couplé de la température et de la vitesse de cisaillement sur la viscosité.

Les énergies d'activation calculées pour les différentes vitesses de cisaillement ( $\dot{\gamma} = 0,1$  à  $100$  s<sup>-1</sup>) sont récapitulées dans le **Tableau 21**. Les énergies d'activation apparaissent inversement proportionnelles à la vitesse de cisaillement et diminuent lorsque ces dernières augmentent (**Figure 68**). Pour une vitesse de cisaillement  $\dot{\gamma}= 0,1$  s<sup>-1</sup> elle est de  $7,1$  kcal.mol<sup>-1</sup> et elle est trois fois plus faible ( $E_a= 2,65$  k cal.mol<sup>-1</sup>) pour une vitesse de cisaillement  $\dot{\gamma}= 100$  (s<sup>-1</sup>).

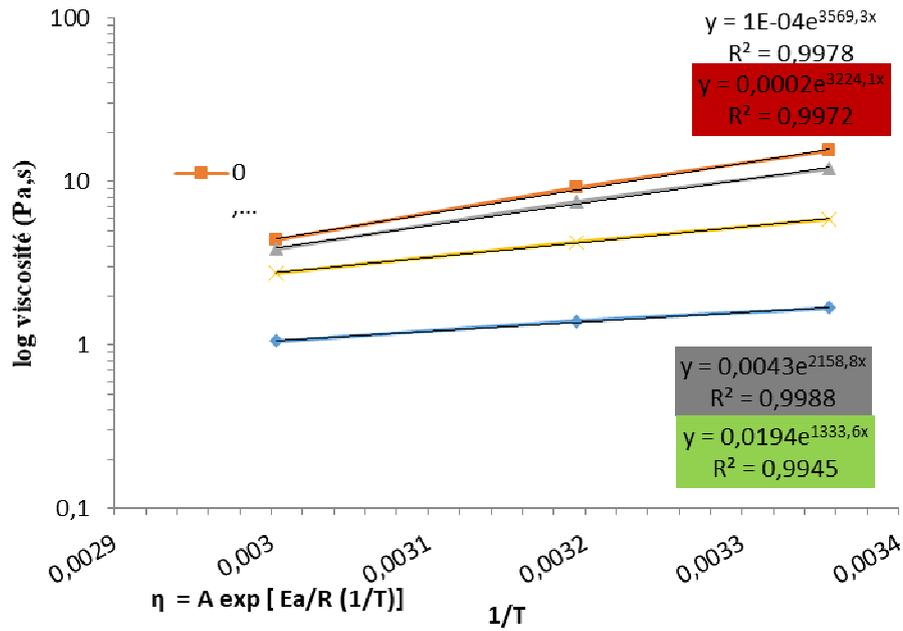
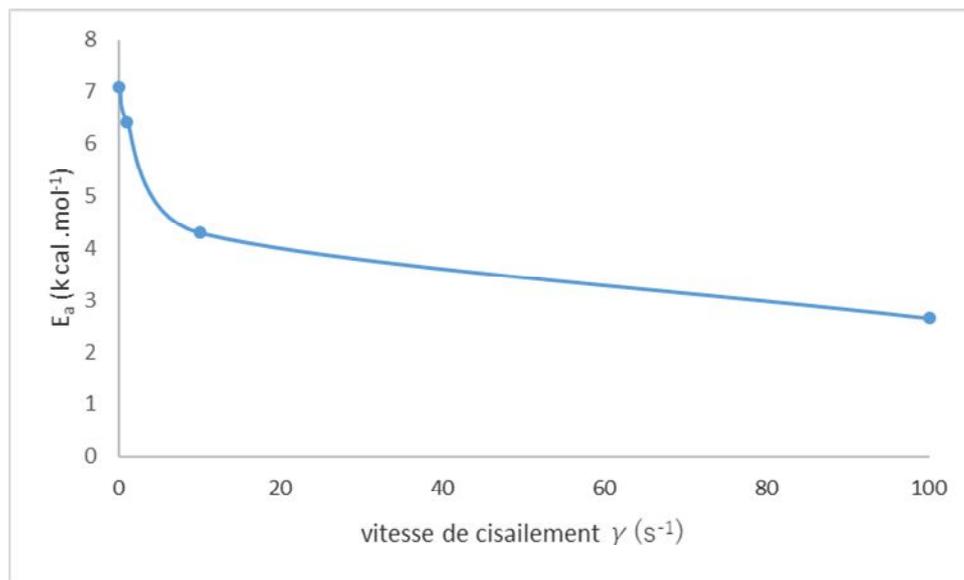


Figure 67: Effet de la température en fonction de la vitesse de cisaillement sur la viscosité du GM d'A. gombo à 4 % (m/v).

Tableau 21: Energies d'activation calculées pour les différentes vitesses de cisaillement (γ̇ = 0,1 à 100 s<sup>-1</sup>).

γ̇ (s <sup>-1</sup> )	E <sub>a</sub> /R	E <sub>a</sub> (kcal.mol <sup>-1</sup> )
0,1	3569,3	7,1
1	3224,1	6,4
10	2158,8	4,29
100	1333,6	2,65



**Figure 68: Effet de la vitesse de cisaillement sur l'énergie d'activation de GM 4 %**

### 3.4. Propriétés biologiques et évaluation du potentiel prébiotique du GM extrait des graines d'*A. gombo* Bunge.

#### 3.4.1. Détermination de la digestibilité du GM extrait des graines d'*A. gombo* Bunge.

Les poly- et oligosaccharides sont des sources potentielles de fibres alimentaires et/ou de prébiotiques. Ces derniers sont définis comme une classe de fibre qui modifie de façon bénéfique la microflore colique. Les premières descriptions de prébiotiques remontent au milieu des années 1990. Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent sélectivement la croissance ou l'activité de certaines bactéries bénéfiques qualifiées de probiotiques telles que les Bifidobacteria et les Lactobacilli (Sarkar 2007). Les prébiotiques sont pour la plupart de nature oligosaccharidiques tels que les fructooligosaccharides (FOS), les xylooligosaccharides (XOS) ou les galactooligosaccharides (GOS) (Buttriss et Stokes 2008). Ils peuvent être produits à partir des polysaccharides par hydrolyse enzymatique.

L'allégation prébiotique a été modifiée en 2004 par les travaux de Gibson *et al.* (2004). Un prébiotique est un ingrédient sélectivement fermenté qui permet des changements spécifiques, à la fois dans la composition et/ou l'activité dans la microflore gastro-intestinale, qui confèrent des avantages à l'hôte).

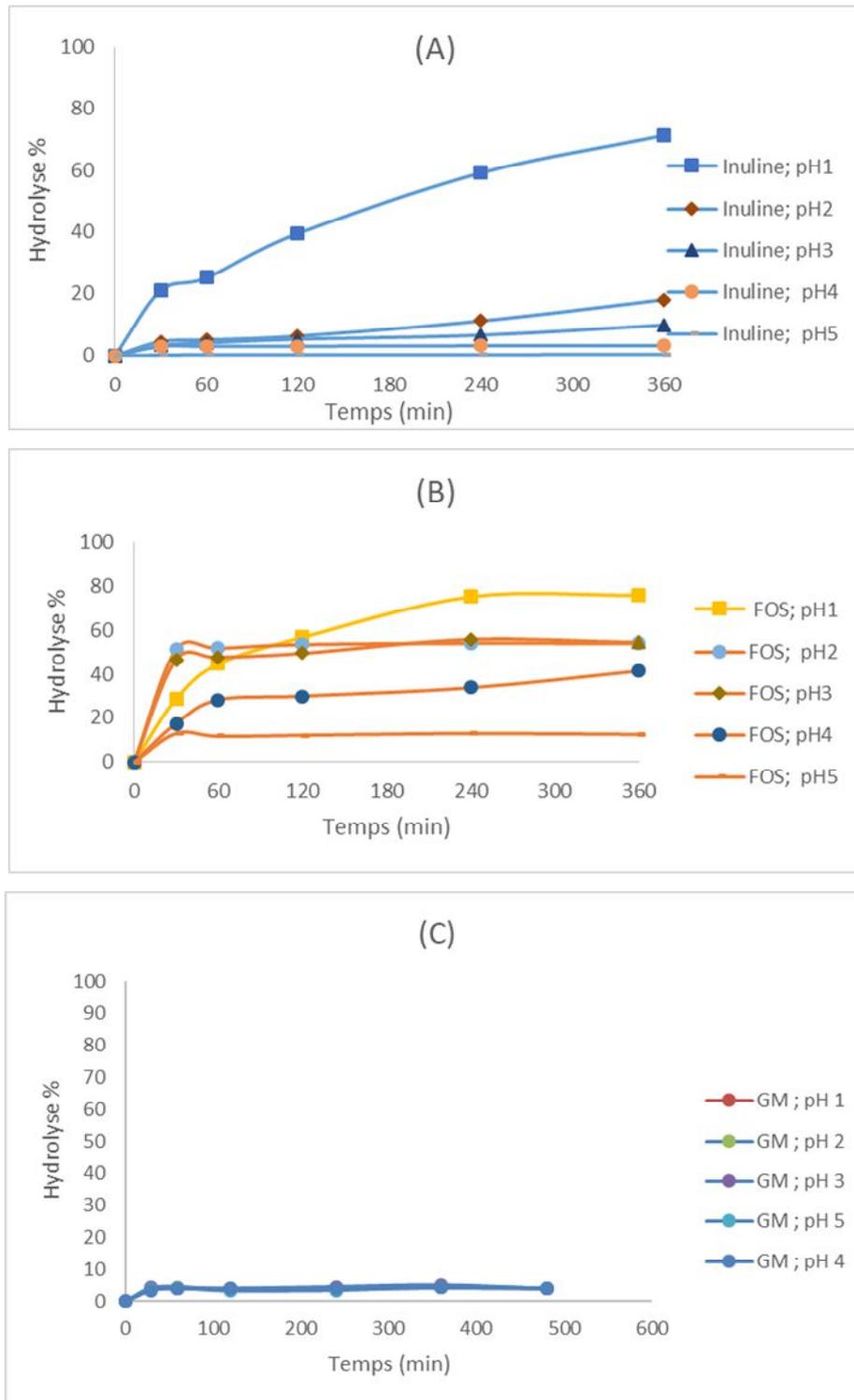
Pour être considéré comme prébiotique, un ingrédient alimentaire doit :

- a. Résister à l'acidité gastrique, à l'hydrolyse par les enzymes de mammifères et à l'absorption dans le tractus gastro-intestinal supérieur ;

- b. Etre fermenté par la microflore intestinale (sélectivement pour un nombre limité de bactéries endogènes).
- c. Stimuler sélectivement la croissance et/ou l'activité des bactéries intestinales potentiellement associées à la santé et au bien-être.
- d. Induire des effets intestinaux ou systémiques bénéfiques pour la santé de l'hôte.

Plusieurs auteurs exigent trois critères pour mesurer l'efficacité d'un prébiotique : (i) la résistance à l'acidité de l'estomac et aux activités enzymatiques du système digestif, (ii) la possibilité d'être fermenté par les micro-organismes de la flore intestinale et, (iii) la modulation et la stimulation de la croissance des bactéries bénéfiques au niveau de l'intestin (Laparra et Sanz, 2010). Par conséquent, la résistance à la digestion, du **GM** extrait des graines d'*A. gombo* Bunge a été testé en vue de son utilisation future comme substrat carboné pour la souche *Lactobacillus rhamnosus*.

Le **GM** et des prébiotiques commerciaux (FOS et inuline) ont été soumis à une hydrolyse par un suc gastrique artificiel. Chaque composé a été mis en solution à 1 % (m/v) dans l'eau distillée et sa digestibilité a été évaluée selon la méthode décrite par Korakli et *al.*, (2002). Le pourcentage de digestibilité a été calculé en se basant sur le taux de sucres réducteurs libérés et le contenu en sucre totaux de l'échantillon. Les résultats sont représentés par la **Figure 69**. Le **GM** extrait des graines d'*A. gombo* Bunge, l'inuline et les FOS ont été incubés pendant 6 h dans un suc gastrique artificiel à différents pH compris entre 1 et 5 à 37 °C. Les résultats montrent que les pourcentages d'hydrolyse augmentent avec la diminution du pH du jus gastrique artificiel pour l'Inuline et les FOS (**Figure 69**). Les degrés d'hydrolyse enregistrés au pH de 1, 2, 3, 4 et 5 étaient de 71,1 %, 18,2 %, 10,0 %, 3,3 % et 0,4 % ; respectivement pour l'inuline. Ils étaient de 75,71 % ; 55,79 % ; 54,38 % ; 41,48 % et 12,41 %, pour les FOS aux mêmes pH. Le **GM** extrait des graines d'*A. gombo* Bunge s'est révélé plus résistant à l'hydrolyse acide avec un taux maximal d'hydrolyse maximale de 4,47 % après 6 h d'incubation au pH 1.



**Figure 69: Hydrolyse de l'inuline (A), des FOS (B) et du GM des graines d'*A. gombo* (C) incubés pendant 6 h dans des sucs gastriques artificiels à des pH compris entre 1 et 5 à 37 °C.**

Les aliments sont habituellement retenus dans l'estomac humain où le jus gastrique (pH 1-3) est libéré dans les deux premières heures après le repas (Rowland et Mallett, 1990 ; Macfarlane et McBain, 1999 ; Wang, 2003 ; Wichienchot *et al.*, 2010). Ainsi, par

extrapolation, on peut estimer que le **GM** des graines d'*Astragalus gombo* ne sera hydrolysé qu'à hauteur de 4,47 % lors de son séjour dans l'estomac. Ce résultat est comparable à ceux obtenus avec d'autres polysaccharides végétaux et bactériens tels que les oligosaccharides du kojio (100% de résistance à l'acide gastrique artificiel) (Nakada *et al.*, 2003), les glucooligosaccharides produits par *Gluconobacter oxydans* (98,4% de résistance), (Wichienchot *et al.*, 2006) ou le dextrane (Debnam *et al.*, 1998).

### 3.4.2. Tests prébiotiques

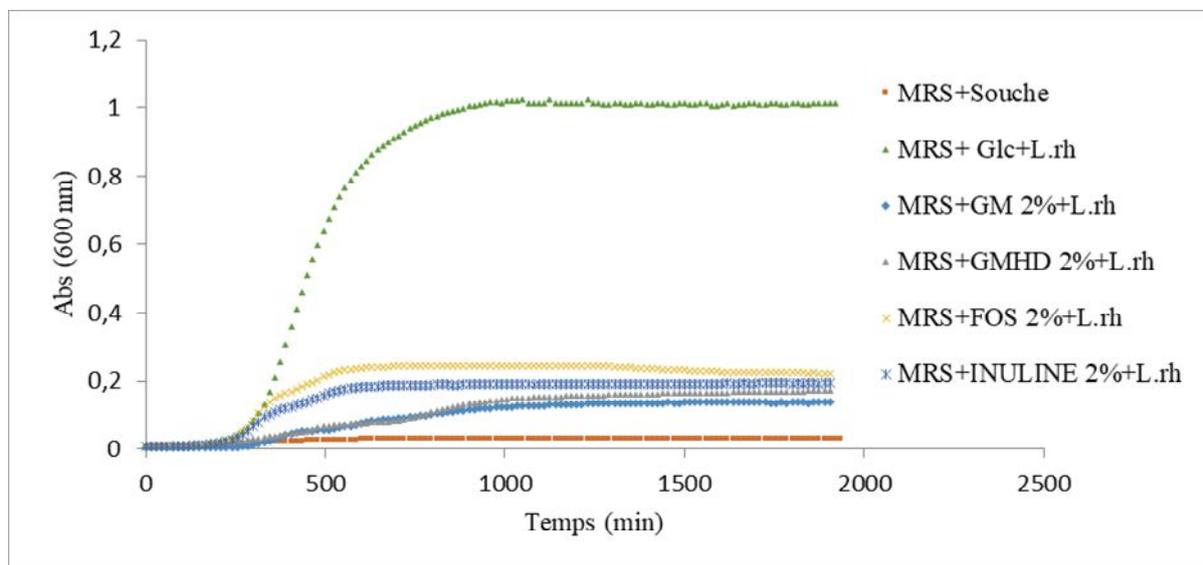
Plusieurs études se sont récemment axées sur le potentiel prébiotique des polysaccharides extraits de sources naturelles, principalement d'origine végétale (Charalampopoulos et Rastall 2009, kumar *et al.*, 2012). Dans ce contexte, certaines propriétés médicinales des GM ont été confirmées par des expérimentations *in vivo* et des tests cliniques chez l'Homme. Ces études ont montré que l'ingestion d'un aliment composé de GM extrait de la gomme de fenugrec, diminue le niveau de la glycémie, le taux de cholestérol sanguin et limite la biosynthèse du cholestérol dans le foie. Les mêmes GM agissent comme prébiotiques et favorisent les bactéries bénéfique du côlon (Mathur, 2012). Par conséquent, les effets prébiotiques des **GM** extraits des graines d'*A. gombo* Bunge et de son hydrolysate (**GMHD**) ont été testés sur la souche *L. rhamnosus* (Guarner *et al.*, 2011). Les cinétiques de croissance ont été réalisées avec une concentration en **GM** et **GMHD** (19,9 kDa) de 2 % (m/v dans le milieu MRS) et comparées à des cultures témoins sur milieux MRS, du glucose (2 %), ou des prébiotiques commerciaux (2 %) tels que les FOS et l'inuline (Bielecka *et al.*, 2002 ; Roberfroid, 2005c ; Bosscher *et al.*, 2006). Le suivi de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* se fait par mesure de la densité optique à 600 nm par un lecteur de microplaques de type bioscreen (PerklinElmer).

La **Figure 70** présente les courbes de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu MRS en présence des différents substrats carbonés. La croissance de *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu MRS est d'abord faible pour tous les substrats testés puis une phase de croissance active est observée jusqu'à la fin de la mesure. La bactérie *Lactobacillus rhamnosus* a montré différentes caractéristiques de croissance en fonction de la source de carbone. La croissance s'est révélée maximale en présence des substrats carbonés par comparaison avec celle observée avec le milieu MRS sans substrat (témoin négatif). Dans tous les milieux de culture en présence des sources carbonées *L. rhamnosus* atteint le maximum de croissance (la phase stationnaire) au bout de 500 min d'incubation avec des DO à 600 nm de 1 pour le milieu

MRS-glucose, de 0,24 pour le milieu MRS-FOS, de 0,19 pour le milieu MRS-inuline, de 0,15 pour le milieu MRS-GMHD et 0,1 pour le MRS-GM.

En présence de glucose la croissance de la souche probiotique est supérieure par rapport aux autres substrats (FOS et inuline). Même si le glucose est un bon précurseur de la croissance de la souche (témoin de croissance) traduit par une croissance importante de la souche ( $DO > 1$ ). Par contre, du fait de son absorption précoce au niveau intestinal le glucose ne peut être considéré comme un prébiotique (Genesite, 2006 ; Saad *et al.*, 2013). Comme observé sur la **Figure 70**, la souche *L. rhamnosus* testée a montré un taux de croissance inférieur dans les milieux de culture supplémentés avec les fractions **GM** et **GMHD** par rapport aux prébiotique commerciaux. Le potentiel prébiotique du **GM** extraits des graines d'*Astragalus gombo* et de son hydrolysats **GMHD** est donc inférieur par rapport à celui des prébiotiques commerciaux (inuline et FOS).

La forte phase de latence observée a été interprétée comme le temps nécessaire pour synthétiser les enzymes adaptées au catabolisme des différents substrats polysaccharidiques et notamment des GM, FOS et inuline. Les inulines et les FOS sont de même nature saccharidique tandis que le **GM** et son hydrolysats sont des galactomannanes. La masse moléculaire élevée des **GM** leurs permet plus de résistance à la dégradation enzymatique comme cela a été évoqué par Charalampopoulos et Rastall (2009).



**Figure 70: Courbes de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu MRS avec différents types de substrats carbonés à 2 % (m/v).**

Bien qu'il soit inférieur à celui des prébiotiques commerciaux, le caractère prébiotique du **GM** et de son hydrolysats est avéré et démontre la capacité des **GM** extraits des graines d'*A. gombo* à être métabolisés par les lactobacilles. En effet, un caractère prébiotique est attribué

à une substance testée dès lors que celle-ci engendre un accroissement de croissance de probiotiques de l'ordre de 0,1 en absorbance (densité optique) après 16 h de culture (Genesite, 2006 ; Saad *et al.*, 2013 ; Donkor *et al.*, 2007 ; Olivera, 2011).

La souche *L. rhamnosus* utilisée dans cette étude métabolise les polysaccharides natifs à une vitesse légèrement inférieure par comparaison avec l'utilisation de leur hydrolysats. Ce résultat apparaît logique du fait de la masse molaire élevée du **GM**.

Par ailleurs, l'effet observé sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* constatée en présence de l'inuline et des FOS d'une part, et dans les milieux de culture MRS supplémentés avec les fractions **GM** et **GMHD** d'autre part est considéré comme faible par rapport au métabolisme de ces mêmes poly- et oligosaccharides (Inuline, FOS, et GM) traduit par la croissance des bifidobactéries sur les mêmes substrats (McLaughlin *et al.*, 2015). La question de sélectivité vis-à-vis des bactéries intestinales bénéfiques a été largement débattue. En effet, une étude sur la diversité catabolique des glucides sur la croissance des lactobacilles et des bifidobactéries a mis en évidence que les milieux MRS contenant des FOS, des galactanes, des **GM**, des arabinogalactanes sont en termes de croissance plus favorables aux bifidobactéries qu'aux lactobacilles (McLaughlin *et al.*, 2015). D'autres études montrent également une utilisation possible de prébiotiques par des bactéries pathogènes (Vardakou *et al.*, 2008 ; Rada *et al.*, 2002; Teitelbaum *et al.*, 2002). Cependant, Teitelbaum et Walker (2002) ont suggéré que l'effet des prébiotiques était également indirect, car ce sont les changements dans les compositions du microbiote gastro-intestinal (bifidobactéries, lactobacilles, ainsi que le sous-groupe histolyticum, les bactéroïdes et les clostridies) qui donnent lieu aux effets prébiotiques. En outre, différentes personnes abritent différentes espèces bactériennes et la composition du microbiota peut être affectée par divers autres facteurs tels que l'alimentation, les maladies, les médicaments, les antibiotiques et l'âge (Macfarlane *et al.*, 2006). Il est donc difficile de comparer l'efficacité de l'activité prébiotique du **GM** testé à d'autres composés de masse moléculaire et de concentrations différentes testées dans différentes études avec des souches de microorganismes différentes. A titre d'exemple, Roberfroid *et al.* (1998) ont montré que la structure chimique des fructanes affecte leur utilisation par des souches bactériennes. Ainsi, l'acidification des milieux de culture contenant des FOS est supérieure à celle des milieux contenant de l'inuline. Les FOS sont plus rapidement fermentés que l'inuline par *Lactobacillus paracasei* (Kaplan et Hutkins, 2003). De même, les FOS branchés et linéaires permettent une croissance supérieure de *Bifidobacterium catenulatum* comparativement à l'inuline (Gibson et Wang, 1994a). Le Raftilose® P95 et le Raftiline® synergy1 (un mélange de FOS et

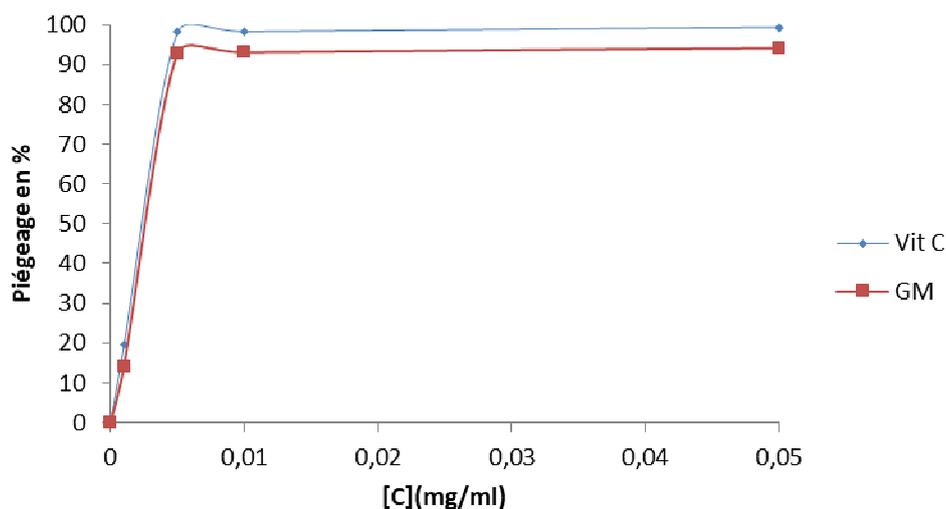
d'inuline) permettent la croissance de *Bifidobacterium animalis* et de *B. lactis*, contrairement à Raftiline® HP (Van der Meulen *et al.*, 2004 ; Janer *et al.*, 2004).

### 3.4.3. Activité antioxydante.

Le stress oxydatif est connu pour générer des espèces réactives oxygénées ERO et des espèces réactives oxygénées et azotées (EROA) oxydantes. Ces espèces peuvent être ou non des radicaux libres. Les trois espèces les plus connues sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) largement décrits pour leur rôle important dans la cancérogenèse (Cuzzocrea *et al.*, 2001). En présence de fer (sous forme  $Fe^{2+}$ ) ces composés sont formés par la réaction de Fenton à partir de  $H_2O_2$ .

Pour lutter contre les dommages oxydatifs, les molécules antioxydantes sont généralement utilisées afin de protéger les cellules humaines en régulant la quantité d'ERO générés. Ces espèces chimiques sont en effet susceptibles d'endommager les macromolécules biologiques telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques et donc les tissus (Halliwell et Auroma, 1991). D'une manière générale, les antioxydants de synthèse, tels que le butylhydroxytoluène (BHT), le tert-butylhydroquinone (TBHQ), le propyl gallate (PG) ou le butylhydroxyanisole (BHA) permettent de lutter contre ces phénomènes oxydatifs (Qi *et al.*, 2005). Néanmoins, leur utilisation dans les aliments est de plus en plus controversée en raison de leur impact potentiel sur la santé des consommateurs (Elboutachfai *et al.*, 2011). L'industrie alimentaire reconnaît donc de plus en plus l'importance des antioxydants d'origine naturelle dans la conception de nouveaux aliments fonctionnels à haute valeur ajoutée.

L'activité antioxydante du **GM** d'*A. gombo* exprimée en  $IC_{50}$  a été déterminée graphiquement. Elle est définie comme étant la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire ou inhiber 50 % du DPPH en solution. Le DPPH ou 2,2-diphényl-1-picryl (hydrazyl) est un radical stable qui peut être utilisé pour évaluer le pouvoir de réduction des radicaux libres par des antioxydants (Han *et al.*, 2016). La **Figure 71** présente les variations du pourcentage de réduction du DPPH en fonction de solutions de **GM** à différentes concentrations. L'acide ascorbique, un antioxydant hydrosoluble de référence a été utilisé comme témoin positif. Le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente logiquement avec l'augmentation de la concentration d'acide ascorbique et celle de **GM**. On observe que le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique est sensiblement supérieur à celui du **GM** pour toutes les concentrations.



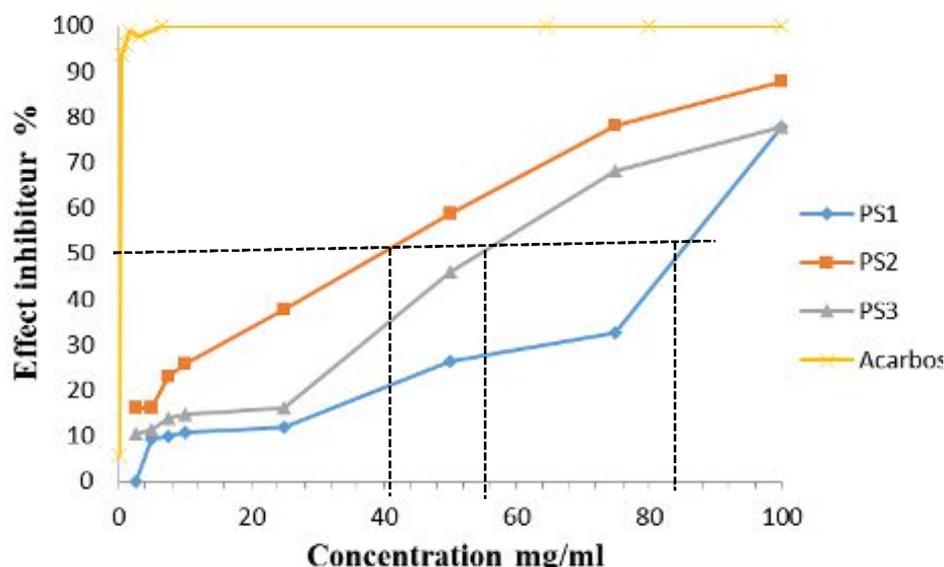
**Figure 71: Réduction du DPPH en fonction de la concentration en extrait polysaccharidique des graines d'*Astragalus gombo* Bunge.**

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour l'acide ascorbique, et le GM des graines d'*A. gombo* étaient de 50 µg/mL soit des résultats supérieurs à ceux de Boual *et al.* (2015) qui ont identifié pour un GM extrait d'*Astragalus armatus* un IC<sub>50</sub> de 33 µg/mL. Plusieurs facteurs influent l'activité antioxydante des polysaccharides, y compris la composition monosaccharidique, la masse moléculaire, le type de liaison glycosidique et la conformation de la chaîne (Zeng *et al.*, 2015). Le mécanisme antioxydant possible et probable des polysaccharides est basé sur leur pouvoir réducteur mais également sur leur capacité de piégeage des ions métalliques catalyseurs des phénomènes oxydatifs (Ye *et al.*, 2008 ; Han *et al.*, 2015).

#### 3.4.4. Inhibiteurs de l'alpha glucosidase et contrôle du diabète

Afin de chercher des inhibiteurs de l'α-glucosidase susceptibles de constituer des médicaments pour le traitement du diabète, l'effet inhibiteur des extraits polysaccharidiques PS1, PS2 et PS3 issus des tiges d'*Astragalus gombo* Bunge a été testé sur l'α-glucosidase.

L'α-glucosidase (EC 3.2.1.20), est une enzyme sécrétée dans l'épithélium de l'intestin grêle. Elle catalyse le clivage des oligosaccharides et les disaccharides en monosaccharides lors de l'étape finale de la digestion des glucides. Des études ont montré que les inhibiteurs de l'α-glucosidase classés comme agents hypoglycémiant oraux (par exemple, l'acarbose et le voglibose) peuvent retarder ou réduire la digestion et l'absorption des glucides.



**Figure 72: Effets inhibiteurs de l'acarbose, PS1, PS2 et PS3 sur l' $\alpha$ -glucosidase.**

L' $\alpha$ -glucosidase joue un rôle central dans la modulation de l'hyperglycémie postprandiale, qui décompose les liaisons  $\alpha$ -(1→4)-glucosidiques et dégrade les poly- et oligoglucosides en glucoses. Des études antérieures ont établi que les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase retardent la production rapide de glycémie après l'absorption alimentaire.

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase des extraits des tiges d'*Astragalus gombo* Bunge a été testée en utilisant le pNPG comme substrat de réaction. Comme le montre la **Figure 72**, les fractions **PS1**, **PS2** et **PS3** ont exercé un effet inhibiteur évident sur l' $\alpha$ -glucosidase, avec une valeur  $IC_{50}$  de 42 mg/mL, 56 mg/mL, 86 mg/mL. Cette action inhibitrice est cependant bien inférieure à celle de l'acarbose utilisé à la même concentration.

### 3.5.5. Etude de l'activité phagocytaire

La phagocytose joue un rôle remarquable dans la défense des humains et des animaux contre de nombreux facteurs infectieux et non infectieux. Puisque les phagocytes agissent comme cellules régulatrices et effectrices dans le système immunitaire, l'amélioration de la fonction des phagocytes devrait être applicable en thérapie contre les infections microbiennes et le cancer. Les polysaccharides végétaux sont bien connus pour posséder une activité immunomodulatrice qui implique principalement la stimulation de l'activité phagocytaire des granulocytes et des macrophages. Un test de phagocytose basé sur l'activation des cellules phagocytaires par l'exposition des macrophages aux différents extraits polysaccharidiques (**PS1**, **PS2** et **PS3**) issus des tiges d'*Astragalus gombo* a donc été réalisé.

**Tableau 22: Capacité phagocytaire (CP%) et Activité phagocytaire (PA%)**

	CP%	PA%
<b>Contrôle (-)</b>	29,33±1,15	0,00
<b>Contrôle (+)</b>	47,67±1,53	18,33
<b>PS1</b>	35,33±1,15	6,00
<b>PS2</b>	38,67±1,15	9,33
<b>PS3</b>	36,00±0,00	6,67

Les trois polysaccharides étudiés ont amélioré cette activité phagocytaire avec des capacités phagocytaires (CP %) évaluées à 35,33±1,15 % pour PS1 ; 38,67 ±1,15 % pour PS2 et 36 %±0 pour PS3 (**Tableau 22**) respectivement et des activités phagocytaires (PA%) de 6,00 % pour **PS1** ; 9,33 pour **PS2** % et 6,67 % pour **PS3** respectivement.

## **CONCLUSION GENERALE**

---

### CONCLUSION GENERALE

Cette thèse est le fruit d'une cotutelle entre l'Université Kasdi Merbah (Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semi arides) et l'Université Clermont Auvergne (Institut Pascal). Son objectif était d'identifier et caractériser les polysaccharides d'une plante récoltée dans le Sahara septentrional algérien : *Astragalus gombo*. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme Hubert Curien Tassili portant sur la recherche de sources végétales et Sahariennes de nouveaux hydrocolloïdes. Après une caractérisation des polysaccharides pectiques issus de tiges d'*Astragalus gombo*, une attention particulière a été portée aux polysaccharides issus des graines de cette plante. Après une extraction aqueuse, à chaud et à pH, neutre la fraction extraite a été partiellement purifiée par précipitation éthanolique et finalement séchée à l'acétone. Le rendement d'extraction obtenu était de 6,8 %. Cette fraction nommée **GM** a été caractérisée pour sa composition en oses et sa structure par des analyses GC/MS, HPAEC, FT-IR et RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ). Les résultats obtenus ont révélé la présence d'un galactomannane comme seul polysaccharide. Ce biopolymère est constitué d'une chaîne principale de résidus mannopyranoses (63 %) liés en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), sur laquelle se greffent des résidus D-galactopyranoses (37 %) par des liaisons  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Le ratio molaire mannose/galactose (M/G) était de 1,7. L'analyse en régime dilué par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière multiangles, la réfractométrie différentielle et la viscosimétrie en ligne a révélé que ce galactomannane a une masse moléculaire moyenne ( $M_w$ ) de  $1,1 \times 10^6$  Da et une viscosité intrinsèque de 860 mL/g.

La caractérisation des propriétés d'écoulement (rhéologie) des solutions de ce galactomannane en régime semi-dilué était typique d'un comportement rhéofluidifiant et une concentration critique de recouvrement ( $C^*$ ) située entre 0,09–0,47 % (m/v) a pu être déterminée. Un comportement viscoélastique classique et conforme à celui décrit pour d'autres galactomannanes a pu être identifié après détermination des modules de conservation ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) avec des solutions de concentrations comprises entre 0,5% à 4 % (m/v). L'étude des propriétés biologiques des polysaccharides extraits a été entreprise en vue de leur attribuer certains usages thérapeutiques traditionnels d'*Astragalus gombo*. Le galactomannane issu des graines de cette plante (**GM**) a montré une digestibilité inférieure à celles des prébiotiques commerciaux (inulines et FOS) et une capacité à être catabolisé par une souche probiotique de référence : *Lactobacillus rhamnosus*. Ces propriétés permettent de le classer comme prébiotique potentiel. Cette activité prébiotique a pu être associée à une activité

## Conclusion générale

---

antioxydante significative ( $IC_{50}$  égale à 50  $\mu\text{g/mL}$  au test DPPH) et comparable à celle de la vitamine C.

L'effet des fractions pectiques et hémicellulosiques isolées des tiges d'*Astragalus gombo* Bunge et nommées (**PS1**, **PS2** et **PS3**) comme inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase a été mesuré et comparé à celui de l'Acarbose, puissant inhibiteur de cette enzyme utilisé en thérapie pour lutter contre le diabète de type 2. Les trois fractions **PS1**, **PS2** et **PS3** ont eu une action inhibitrice sur cette enzyme à hauteur d' $IC_{50}$  de 42, 56, et 86  $\text{mg/mL}$  respectivement. Ces  $IC_{50}$  restent cependant élevées comparé à celle de l'Acarbose. Les mêmes fractions évaluées pour leurs activités et capacités phagocytaires ont amélioré cette activité phagocytaire avec des capacités phagocytaires évaluées à 35,3 % pour **PS1**, 38,7 % pour **PS2** et 36 % pour **PS3** et des activités phagocytaires de 6 % pour **PS1**, 9,3 % pour **PS2** et 6,67 % pour **PS3**.

Ces travaux ont donc permis d'améliorer le niveau de connaissances sur les polysaccharides présents chez *Astragalus gombo* et notamment la caractérisation structurale et physico-chimique d'un galactomannane présent dans les graines de cette plante. Les propriétés biologiques et rhéologiques identifiées devront faire l'objet d'autres investigations mais ouvrent la voie à une possible exploitation de cette plante bien adaptée au climat désertique.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal U.P. (2006). Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). *Planta* 224:1141–1153.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A., (2010). *Plant cell walls: from chemistry to biology*. Garland Science, Taylor Francis Group, New York.
- Andersson S.I., Samuelson, O., Ishihara, M., Shimizu, K., (1983). Structure of the reducing end-groups in spruce xylan. *Carbohydrate Research*, 111:283–288.
- Anderson D.M.W, McNab CGA, Anderson CG, Braown PM, Pringuer MA (1982) Gum exudates from genus *Sterculia* (Gum karaya). *Int Tree Crops Journal*, 2:147.
- Anderson E (1949). Endosperm mucilages of legumes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41 2887.
- Andrade E. N. DA C (1930). The Viscosity of Liquids. *Nature*.125, 582-584.
- Antonini E, Bellelli L, Bruzzesi MR, Caputo A, Chiancone E, Rossi-Fanelli A. (1964). Studies on dextran and dextran derivatives. I. Properties of native dextran in different solvents. *Biopolymers* 2:27.
- Anulov O.V., Smimova N.I., Mestechkina N.M., Shreter L.A. and Shcherbukhin V.D. (1995). Galactomannan from Ambiguous Crazyweed (*Oxytropis ambigua*(Pall.) DC) *Applied Biochemistry and Microbiology*, 31 550.
- Aluko R.E. (2012). *Functional foods and nutraceuticals*. Springer, New York
- Atmodjo M., Hao, Z., Mohnen, D. (2013). Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64:747–779.
- Balakshin M., Capanema, E., Gracz, H., Jameel, H. (2011). Quantification of lignin carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. *Planta* 233: 1097–1110.
- Bao X., Yuan H., Wang C., Liu J. and Lan M., (2013). Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. *Carbohydrate Polymers*, volume 98: 1236-1243.
- Barneby R.C., (1964). *Atlas of North American Astragalus*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 13:1-1188.
- Barsanti L., Passarelli, V., Evangelista, V., Frassanito, A.M., Gualtieri, P. (2011). Chemistry, physicochemistry and applications linked to biological activities of  $\beta$ -glucans. *Natural Product Reports*, 28:457–466.
- Baziz K., (2015). *Organisation Du Génome Et Etude Palynologique De Quelques Espèces Algériennes Du Genre Astragalus L.* thèse de doctorat, Université de Constantine 1. p.127.
- Belghith K.S., Dahech, I., Hamden, K., Feki, A., Mejdoub, H., Belghith, H. (2012). Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (4):1070–1074.
- Bello, F. D., Walter, J., Hertel, C., and Hammes, W. P. (2001). In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst Appl Microbiol* 24, 232-237.

- Bel-Kassaoui H., Lamnaouer, D., Abdennebi, E.H., Jossang, A. (2007). Experimental poisoning by extracts and fractions of *Astragalus lusitanicus* Lam. in sheep. *Revue de Medecine Veterinaire*. 158. pp. 269-273
- Becerra-Jimenez J.M., Valdivia-Urdiales B, Aguilar CN, Martinez-Hernández JL, Contreras-Esquivel JC, Cuellar-Lozano CA (2011) Quitosánfungico: Fuentes y propiedades. *Rev Cient Univ Aut Coahuila*, 3(5):24–32
- Becker T., (2010). Explaining Rarity of the Dry Grassland Perennial *Astragalus exscapus*. *Folia Geobotanica*, Volume 45, (3), pp 303–321.
- Benchelah A.-C. Bouziane H. Maka M.- Ouahés C. (2011). *Fleurs du Sahara*. 2<sup>ème</sup> edition. IBIS PRESS. 255 pages.
- Berteau O, Mulloy B (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 13 : pp 29–40.
- Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54 (2), 484-489.
- Bonnier G. (1905). *Cours de botanique*, Paris, Librairie générale de l'enseignement, p.894.
- Boissier E. (1872). *Astragalus*. 205-498 in *Flora Orientalis*, volume 2. Geneva : H. Georg
- Boual Z., Pierre, G., Delattre, C., Benaoun, F., Petit, E., Gardarin, C., Michaud, P., et Ould El Hadj, M.D. (2015). Mediterranean semi-arid plant *Astragalus armatus* as a source of bioactive galactomannan. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5 (1), 10-18.
- Bourbon A.I., Pinheiro A.C., Ribeiro C., Miranda C., Maia J.M., Teixeira J.A., *Food Hydrocolloids*.24. (2010)184–192.
- Bouzouita N. Khaldi A. Zgoulli S.Chebil L. Chekki R. Chaabouni M.M. Thonart P. (2007). The analysis of crude and purified locust bean gum: a comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chem.*, **101**, 1508-1515.
- Bovey F. A. (1959). Enzymatic polymerization. I. Molecular weight and branching during the formation of dextran. *J Polym Sci* 35:167.
- Bowles LK (1996). Amylolytic enzymes. In: Hebeda RE, Zobel H.F., *Baked goods freshness*. Marcel Dekker, New York, pp 105–129.
- Brown DM, Zhang Z, Stephens E, Dupree P and Turner SR (2009). Characterization of IRX10 and IRX10-like reveals an essential role in glucuronoxylan biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* 57:732–746.
- Braccini, I., Grasso, R.P., and Pérez, S. (1999). Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modelling investigation. *Carbohydr. Res.* 317, 119–130.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Buckeridge MS, Dietrich SMC, de Lima DU (2000b). Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. *Dev Crop Sci* 26:283–316.
- Buckeridge M.S. and Reid, J.S.G (1996). *Cienc. Cult*, 48 153.
- Buckeridge M.S. and Dietrich, S.M.C. (1996), *Plant Sci.*, 117.

## Références bibliographiques

---

- Bunge A. (1868). Generis Astragali species Gerontogae. Pars prior. Claves diagnosticae. Memoirs de l'Academie Imperiale des Sciences de St. Petersburg, ser. VII, 11: 1-140.
- Burton R.A. and Fincher, G.B., (2009). (1,3 ;1,4)-beta-D-glucans in cell walls of the poaceae, lower plants, and fungi: a tale of two linkages. *Molecular Plant*, 2(5):873-82.
- Burchard W., Schmidt M. and Stockmayer W.H. (1980). Information on poly-dispersity and branching from combined quasi-elastic light scattering. *Macromolecules*, 13, 1265-1272.
- Busi M.V., Martin M, Gomez Casati DF (2012) Plant biotechnology for the development of design starches. In: Karunaratne DN. The complex world of polysaccharides. pp 491–510
- Caesar L. N., 2007- Etude de la phytochimie et des activités biologiques de deux plantes utilisées en médecine traditionnelle gabonaise : *Terminalia catappa* L. (*Combretaceae*) ET *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. (*Crassulaceae*). Thèse de doctorat. Université de bamako, 179p.
- Caffall KH., Mohnen D (2009): The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344:1879–1900.
- Candolle, P. (1802). Astragalogia, nempe Astragali, Biserrulae et Oxytropidis, nec non Phaca, Coluteae et Lessertiae, *Historia iconibus illustrata*, Joann Bapt Garnery, Paris.
- Campbell, J. M., Fahey, G. C., Lichtensteiger, C. A., Demichele, S. J., and Garleb, K. A. (1997). An enteral formula containing fish oil, indigestible oligosaccharides, gum arabic and antioxidants affects plasma and colonic phospholipid fatty acid and prostaglandin profiles in pigs. *J Nutr* 127, 137-145.
- Campbell J.M. et Reid, J.S.G., *Planta*, 155 (1982) 105.
- Caratini R., 1984. Les plantes. Ed. Bordas, Paris.
- Carneiro AA, Ferreira IC, Duenas M, Barros L, da Silva R, Gomes E, Santos-Buelga C (2013) Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry*, 138(4):2168–2173
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3:1–30
- Chaires-Martinez L., Salazar-Montoya J.A., Ramos-Ramirez E.G., (2008). Physicochemical and functional characterization of the galactomannan obtained from mesquite seeds (*Prosopis pallida*). *European Food Research and Technology*, 227, 1669–1676.
- Chaudhary L.B., Rana, T.S., Anand K.K., (2008). Current status of the systematics of *Astragalus* L. (Fabaceae) with special reference to the Himalayan species in India. *Taiwania*, 53: 338-355.
- Chaudhary L.B., Rana T.S., Narzary D., Verma S., (2007). A new species of *Astragalus* L. (Leguminosae) from India based on morphological and molecular markers. *Biological Journal of the Linnean Society*, 154: 27-34.
- Cerqueira M.A., Pinheiro A.C., Souza B.W.S., Lima A.M., Ribeiro C., Miranda C. (2009). Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydrate Polymers*, 75 408–414.

## Références bibliographiques

---

- Cerqueira M.A., Souza, B.W.S., Simões, J., Teixeira, J.A., Domingues, M.R.M., Coimbra, M.A. and Vicente, A.A. (2011). Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. *Carbohydrate Polymers*, 83 (1), 179-185.
- Cerqueira M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins JT, Souza BWS, Teixeira JA, Vicente AA (2011) Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends in Food Science and Technology*, 22(12): 662–671
- Cho W.C.S., Leung K.N., (2007). In vitro and in vivo antitumor effects of *Astragalus membranaceus*. *Cancer Letters*, 252 (2007) 43–54
- Chen C-C., Lee, H-G., Chang J-H. Chen S-S. Li T-C., Tsai C-H., Cho D-Y., and Hsieh C-L. (2012). Chinese Herb *Astragalus Membranaceus* Enhances Recovery of Haemorrhagic Stroke: Double Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, volume 2012, 1–11.
- Chen W., Li Y-M., Yu M-H. (2010). *Astragalus* Polysaccharides Inhibited Diabetic Cardiomyopathy in Hamsters Depending on Suppression of Heart Chymase Activation. *Journal of Diabetes and Its Complications*, volume 24, no. 3, 199–208.
- Cheng Y., Tang K., Wu S., Liu L., Qiang C., Lin X., Liu B. (2011). *Astragalus* Polysaccharides Lowers Plasma Cholesterol through Mechanisms Distinct from Statins. *PLoS ONE*, edited by Christian Schulz, volume 6, no. 11, p. e27437.
- Cheung P.C.K (2008). *Mushrooms as functional foods*. Wiley. 268 pages.
- Cho W. C. S., (2011). *Evidence-Based Anticancer Materia Medica*. Springer Netherlands.
- Ciucanu I., Kerek F., (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 131.209-217.
- Ciucanu I., Costello C.E., (2003). Elimination of oxidative degradation during the permethylation of carbohydrates. *Journal American Chemical Society* .125. 16213-9.
- Collic-Jouault S., Zanchetta P. , Helley D., Ratiskol J., Siquin C., Fischer A. M. and Guezennec J. (2004). Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en thérapeutique humaine. *Pathologie Biologie*. Volume 52, (3). Pages 127-130
- Colonna, P., Thibault, J.F. (1986). Propriétés physico-chimiques des polysaccharides. In : Propriétés fonctionnelles des polysaccharides (p. 19-46).
- Comin L. M., TEMELLI F. and SALDAÑA M. D. A., 2015- Flax mucilage and barley beta-glucan aerogels obtained using supercritical carbon dioxide : Application as flax lignan carriers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, volume 28: 40-46.
- Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro SL, Oliviera RM, Sabry DA, Camara RBG, Nobre LTDB, Costa M.S.S.P, Almeida-Lima J, Farias EHC, Leite EL, Rocha HAO (2010) Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 64:21–28.
- Courtois J.E. et Le Dizet, P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (1963) 743.

## Références bibliographiques

---

- Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, Alhaique F (2007) Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release* 119:5–24
- Cronk Q., Ojeda I., Pennington R.T., (2006). Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 99-103.
- Cunha P.L.R., Vieira I.G.P., Arriaga A.M.C., De Paula R.C.M., Feitosa J.P.A. (2009). Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. Seeds as a potential guar gum substitute *Food Hydrocolloids*, 23, 880–885.
- Cuzzocrea S., Riley D.P., Caputi A.P., Salvemini D. (2001). Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* 53: 135–159.
- Dahech I., Belghith K.S. Hamden K. Feki A. Belghith H. and Mejdoub H. (2011). Antidiabetic Activity of Levan Polysaccharide in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, volume 49, no. 4, pp. 742–46.
- Dahech I, Belghith KS, Hamden K, Feki A, Belghith H, Mejdoub H (2011). Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *Int J Biol Macromol* 49(5): 942–947
- Dahlmann D.L., Rana, R.L., Schepers, E.J., Schepers, T., DiLuna, F.A. and Webb, B.L. (2003). A gene from a parasitic wasp expressed in teratocytes inhibits host protein synthesis, growth and development. *Insect Mol. Biol.*, in press.
- Dakia P.A., Blecker C., Robert C., Wathelet B., and Paquot M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22 (5), 807-818.
- Datta H.S., Mitra, S. K., Paramesh, R., and Patwardhan, B. (2011). Theories and Management of Aging: Modern and Ayurveda Perspectives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, volume 2011, pp. 1–6.
- Daoud K.M. (1932). The reserve polysaccharide of the seeds of fenugreek: Its digestibility and its fate during germination. *Biochemical Journal*, 26, 255-263.
- Davis A.M. (1982). Crude protein, crude fiber, tannin, and oxalate concentrations of 33 *Astragalus* species. *Journal of Range Management*, 35 (1), 32-34.
- De Paula, R. C. M., Santana, S. A., and Rodrigues, J. F. (2001). Composition and rheological properties of *Albizia lebbek* gum exudate. *Carbohydrate Polymers*, 44(2), 133-139.
- De Paula, R.C.M., and Rodrigues, J.F. (1995). Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Carbohydrate Polymers*, 26, 171-181.
- Dea I.C.M., et Morrison, A. (1975). Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 241-312.
- Delattre C., Pierre G., Gardarin C., Traikia M., Elboutachfai R., Isogai A., et Michaud P. (2015). Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. *Carbohydrate Polymers*, 116, 34-41.
- Dey, P.M. *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, 35 (1978) 341.

- Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P (2004) Guar seed beta-mannan synthase is a member of the cellulose synthase super gene family. *Science* 303:363–366
- Di Donato, P., Poli A., Taurisano V., et Nicolaus B., (2015). In Kishan Gopal Ramawat, K. G. and Mérillon, J-M. *Polysaccharides Bioactivity and Biotechnology*. 604-634.
- Dionísio, M., and Grenha, A. (2012). Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4 (3), 175-185.
- Dirk, L.M.A., Van der Krol, A.R., D. Vreugdenhil, Hilhorst, H.W.M. and Bewley, J.D. (1999). Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 41.
- Dobignard A., Chatelain C., (2010-2013). *Index synonymique et bibliographique de la flore. Conservatoire and Jardin Botaniques, Genève.*
- Duff, R.B., (1965). The occurrence of apiose in *Lemna* (duckweed) and other Angiosperms. *Biochem J* 94:768–772
- Dufresne, A., (2015). In Ramawat, K. G. et Mérillon, J-M. *Polysaccharides Bioactivity and Biotechnology*. 420
- Duke, J.A. (2008). *Duke's Handbook of Medicinal Plants of the Bible*. CRC Press.
- Ebrahimzadeh H., Niknam V., Maassoumi A.A., 1999. Nitro compounds in *Astragalus* species from Iran. *Biochem. Syst Ecol*, 27: 743-751.
- Ebringerova A, Heinze T (2000) Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylns structures, isolation procedures and properties. *Macromol Rapid Commun* 21:542–556
- Ebringerova A, Hromadkova Z, Heinze T (2005) Hemicellulose. *Adv Polym Sci* 186:1–67.
- Elboutachfati R., Petit E., Pillon M., Courtois B., Courtois J., Delattre C., 2011. Evaluation of antioxidant capacity of ulvan-like polymer obtained by regioselective oxidation of gellan exopolysaccharide. *Food Chemistry* 127, 976-983.
- Efthimiadou E.K., Metaxa A-F, and George Kordas (2015). Modified in *Polysaccharides for Drug Delivery* in In Ramawat, K. G., and Mérillon J. M., editors. *Polysaccharides*. Springer International Publishing, 2015.
- El Enshasy HA, Hatti-Kaul R (2013) Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends Biotechnol* 31(12):668–677.
- El Hamidi M., Leipold H.W., (1989). Poisoning of Sheep by *Astragalus lusitanicus* in Morocco: Field and Experimental Studies. *J Vet Med Series A*, 36: 115-121.
- Ehrmann M. A., Korakli, M., and Vogel, R. F. (2003). Identification of the gene for  $\alpha$ -fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140T and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 46, 391 - 397.
- Eli W, Chen W, Xue Q (1999). The association of anionic surfactants with  $\beta$ -cyclodextrin. An isothermal titration calorimeter study. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 31(10):1283-1296.

- Ertesvåg H, Erlien F., Skjåk-Braek G., Rehm B.H., Valla S. (1998) .Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J Bacteriol.* ; 180 (15):3779-84.
- Eyring, H. (1935). The Activated Complex in Chemical Reactions, *J. Chem. Phys.*, 3, 107-115.
- Evanko S, Tammi M, Tammi R, (2007). Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev.* 59 (13):1351-65.
- Faik A, Chileshe C, Sterling J, Maclachlan G (1997). Xyloglucan galactosyl- and fucosyltransferase activities from pea epicotyl microsomes. *Plant Physiol* 114:245–254
- Faik A (2010) Xylan biosynthesis: news from the grass. *Plant Physiol* 153:396–402
- Faik A (2013) Chapter 1: “Plant cell wall structure-pretreatment” the critical relationship in biomass conversion to fermentable sugars. In: *Green biomass pretreatment for biofuels production*, SpringerBriefs in molecular science. Springer, Dordrecht, pp 1–30
- Farias WRL, Valente AP, Pereira MS, Mourao PAS (2000). Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. *J Biol Chem* 275:29299–29307
- Fariña J. I., Viñarta S. C., Cattaneo M., Figueroa L. I. (2009). Structural stability of *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126  $\beta$ -glucan with fermentation time: a chemical, infrared spectroscopic and enzymatic approach. *J Journal of Applied Microbiology* 106 221–232.
- Fenyvesi E, Szenté L, Russell NR, McNamara M (1996). Specific guest types. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, 3:305-366.
- Fincher GB (2009a). Revolutionary times in our understanding of cell wall biosynthesis and remodeling in the grasses. *Plant Physiol* 149:27–37.
- Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau JP, Kato Y, Lorences EP, Maclachlan GA, McNeil M, Mort AJ, Reid JSG, Seitz HU, Selvendran RR, Voragen AGJ, White A.R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan- derived oligosaccharides. *Physiol Plant* 89:1–3
- Funasaki N, Ohigashi M, Hada S, Neya S. (2000). Surface Tensiometric Study of Multiple Complexation and Hemolysis by Mixed Surfactants and Cyclodextrins. *Langmuir*.16 (2):383-388.
- Gandhi NS, Mancera RL (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 72:455–482.
- Ganter A.T.M., Cardoso, M. Kaminski, and Reicher, F. (1997). Galactomannan from the Seeds of *Mimosa Scabrella*: A Scale-up Process. *International Journal of Biological Macromolecules* 21 (1): 137–140.
- Gao X.P, Zhao W.X, Zhang Z.L, (2001). Effect of huang qizengmian powder on interstitial response in patients with oesophageal cancer at peri-operational period. Vol 2: 3-171p.
- Garcia-Ochoa F. Santosa V.E., Casas J.A., Gomeza E (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* (18) 549 – 579.
- Gardès M.A., Bonnefont R. D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003). Espèces Réactives de L’oxygène. *L’actualité Chimique*, p. 91.

## Références bibliographiques

---

- Ge Y., Duan Y., Fang G., Zhang Y., Wang S. (2009). Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: Isolation, purification, structural features and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*. Volume 77, (2), 10, Pages 188-193.
- Gentry H.S., (1957). Gum Tragacanth in Iran. *Econ Bot*, 11: 40-63.
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiol* 137 1228–1235.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125, 1401–1412.
- Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X. and Cumming, J.H. (1995). Selective stimulation of *bifidobacteria* in the human colon by FOS and inulin. *Journal of Dairy Science*. 108, 975-982.
- Gibson, G. R., and Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr* 130, 391S-395S.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., van Loo, J.A.E., Rastall, R.A. and Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Review*. 17, 259-275.
- Gray A., (1864). A revision and arrangement (mainly by the fruit) of the North American species of *Astragalus* and *Oxytropis*. *Proc Amer Acad Arts*, 6: 188-236.
- Gomez-Sosa, (1979). Las especies Sudamericanas del genero *Astragalus* (Leguminosae) I. Las especies Patagónicas Argentinas. *Darwiniana* 22: 313-376.
- Gontscharov N.F., Borissova A.G., Gorskova S.G., Popov M.G., Vassilzenko I.T., (1946). *Astragalus*. In: Komarov VL, Shishkin BK (eds.) *Flora URSS*, volume 12. *Editio Academiae Scientiarum URSS*, Moskow, Leningrad, pp. 1-918.
- Guo YJ, Liu G, Wang X, Jin D, Wu M, Ma J, *et al*. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 422-6.
- Han X. Shen S. Liu T. Du X. Cao X. Feng H. Zeng X. (2015). Characterization and antioxidant activities of the polysaccharides from *Radix Cyathulae officinalis* Kuan. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 72, Pages 544-552
- Han S. (2013). *Astragalus* Polysaccharide Induces Anti-Inflammatory Effects Dependent on AMPK Activity in Palmitate-Treated RAW264.7 Cells. *International Journal of Molecular Medicine*. Pages: 1463-1470.
- Harris P.J., Henry, R.J., Blakeney, A.B., and Stone, B.A. (1984). An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 127 (1), 59-73.
- Hart D.A, Kindel PK (1970). A novel reaction involved in the degradation of apiogalacturonans from *Lemna minor* and the isolation of apiobiose as a product. *Biochemistry* 9:2190–2196.

## Références bibliographiques

---

- Hatakeyama T., Naoi, S. and Hatakeyama, H. (2004). Liquid crystallization of glassy guar gum with water. *Thermochimica Acta*, 416, 121–127.
- Hayashi T, Marsden MP, Delmer DP (1987). Pea xyloglucan and cellulose: VI. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiol* 83:384–389.
- Hayashi H (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molecular Biology*, 40:139–168
- Hayashi T, Kaida R (2011) Functions of xyloglucans in plants. *Mol Plant* 4:17–24 Hepler PK (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* 17:2142–2155.
- He, X., Bai, Y., Zhao, Z., Wang, X., Fang, J., Huang, L., Zeng, M., Zhang, Q., Zhang, Y., and Zheng, X. (2016). Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 187, 160-182.
- Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, (2001). Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest.*, 119 (suppl1):64S-94S.
- Hernandez, V., Morta, F., and Melendez, P. (2012). A study of medicinal species and their ethnomedicinal values in Caparo Barinas, Venezuela. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24, 128-132.
- Hoffman M, Jia ZH, Pena MJ, Cash M, Harper A, Blackburn AR, Darvill A, York WS (2005). Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydrate Research*, 340:1826–1840
- Hoffmann R, Paper DH, Donaldson J, Alban S, Franz G (1995) Characterization of a laminarin sulphate which inhibits basic fibroblast growth factor binding and endothelial cell proliferation. *J Cell Sci* 108:3591–3598.
- Huang Z. Zhang L. (2009). Chemical structures of water-soluble polysaccharides from *Rhizoma Panacis Japonici* *Carbohydrate Research*. Volume 344, (9). Pages 1136-1140
- Hussain, M., Bakalis, S., Gouseti, O., Zahoor, T., Anjum, F.M., and Shahid, M. (2015). Dynamic and shear stress rheological properties of guar galactomannans and its hydrolyzed derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 687-691.
- Imamura T, Watanabe T, Kuwahara M, Koshijima T (1994) Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*. *Phytochemistry* 37:1165–1173.
- Ioan CE, Aberle T, Burchard W (2000). Structure properties of dextran. 2. Dilute solution. *Macromolecules* 33:5.
- Ishii T, Matsunaga T (1996). Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, 284:1-9
- Izydorczyk M, Brummer Y, Cui SW, Wang Q, Liu Q, Xie SX (2005). Food carbohydrates. Chemistry, physical properties, and applications. CRC Press, Boca Raton
- James L.F., Shupe J.L., (1986). Selenium accumulators. In *current Veterinary Therapy, Food animal practice two*, Howard J.L., ed. Philadelphia, WB Saunders: pp 394-396.

- James L.F., Hartely W.J., Williams M.C., Van Kampen K.R., (1980). Field and experimental studies in cattle and sheep poisoned by nitrobearing *Astragalus* or their toxins. *Am J Vet Res*, 41: 377- 382.
- James L.F., Van Kampen K.R., Hartley W.J., 1983. *Astragalus bisulcatus*: a cause of selenium or Locoweed poisoning. *Vet. Human Toxicology*, 25 (2): 86- 89.
- James L.F., Van Kampen K.R., (1974). Effect of protein and mineral supplementation on potential locoweed (*Astragalus* spp.) poisoning in sheep. *J Am Vet Med Assoc*, 164: 1042-1043.
- Janer, C., Rohr, L., Pelaez, C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T., and Meile, L. (2004). Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Syst Appl Microbiol* 27, 279-285.
- Jani GK, Shah DP, Prajapati VD, Jain VC (2009). Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian J Pharm Sci* 4(5):309–323.
- Jaulneau V, Lafitte C, Jacquet C, Fournier S, Salamagne S, Briand X, Esquerre -Tugaye MT, Dumas B (2010) Ulvan, a sulphated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. *J Biomed Biotechnol* 2010:1–11.
- Jia, R., Cao, L., Yin, G., Pao, X., Galina, J., ( 2012) .In Vitro and in Vivo Hepatoprotective and Antioxidant Effects of *Astragalus* Polysaccharides against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatocyte Damage in Common Carp (*Cyprinus Carpio*).” *Fish Physiology and Biochemistry*, volume 38, no. 3, pp. 871–81.
- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart S (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar Drugs* 9:196–223
- Jiang, J.B., Qiu, J.D., Yang, L.H., He, J.P., Smith, G.W., and Li, H.Q. (2010). Therapeutic effects of *Astragalus* polysaccharides on inflammation and synovial apoptosis in rats with adjuvant- induced arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 13, 396-405.
- Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Pulido R, Saura-Calixto F (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of Science of Food and Agriculture* 81: 530-534.
- Jin M., Qingsheng H., (2013). Biological Activities and Potential Health Benefit Effects of Polysaccharides Isolated from *Lycium Barbarum* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, volume 54, pp. 16–23.
- Jin M., Zeqing L., (2012). Effects of Se-Enriched Polysaccharides Produced by *Enterobacter Cloacae* Z0206 on Alloxan-Induced Diabetic Mice.” *International Journal of Biological Macromolecules*, volume 50, no. 2, pp. 348–52.
- Jin M., Youming W., (2010). Preparation and Biological Activities of an Exopolysaccharide Produced by *Enterobacter Cloacae* Z0206. *Carbohydrate Polymers* volume 81, no. 3, pp. 607–11.
- Jin M., Ke Z., (2014). Structural Features and Biological Activities of the Polysaccharides from *Astragalus Membranaceus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, volume 64, pp. 257–66.
- Johansson MH, Samuelson O (1977). Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation. *Wood Sci Technol* 11:251–263

## Références bibliographiques

---

- Johnston I.M., 1938. Notes on some *Astragalus* species of Ecuador and Peru. *J. Arnold Arbor*, 19:88-96.
- Jones M.E., 1923. Revision of North American *Astragalus*. Published by the author, Salt Lake City, Utah.
- Josepha M. M., Aravind S. R., George S. K., Pillai K. R., Mini S. and Sreelekha T.T., (2014). Antitumor activity of galactoxyloglucan-gold nanoparticles against murine ascites and solid carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, volume 116: 219-227.
- Jouanneau D, Guibet M, Boulenguer P, Mazoyer J, Smietana M, Helbert W (2010) New insights into the structure of hybrid [ $\kappa$ ]-/ $\mu$ ]-carrageenan and its alkaline conversion. *Food Hydrocoll* 24:452–461.
- Kabel, M. A., Kortenoeven, L., Schols, H. A., and Voragen, A. G. (2002). In vitro fermentability of differently substituted xylooligosaccharides. *J Agric Food Chem* 50, 6205-6210.
- Kačuráková M.; Wilson R.H.(2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*. Volume 44, (4). Pages 291-303.
- Kamerling J.P. (2007). *Comprehensive glycoscience*. Elsevier, Dordrecht.
- Kanlayavattanakul, M. and Nattaya, L. (2015). Biopolysaccharides for Skin Hydrating Cosmetics. In *Polysaccharides*. Springer International Publishing, 2015.
- Kaplan, H., and Hutkins, R. (2003). Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol* 69, 2217-2222.
- Kapoor V.P. and Mukherjee, S., *Phytochemistry*, 10 (1971) 655.
- Kapoor V.P., Taravel, F.R., Joseleau, J.-P., Milas, M., Chanzy, H., and Rinaudo, M. (1998). Cassia spectabilis DC seed galactomannan: Structural, crystallographical and rheological studies. *Carbohydrate Research*, 306 (1), 231-241.
- Karmakar P, Grosh T, Sinha S, Saha S, Mandal P, Ghosal PK, Ray B (2009) Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastratica*: characterization of a sulfated fucan. *Carbohydrate Polymers*. 78:416–421
- Kauss H, Jeblick W, Domard A (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* 178: 385–392.
- Kazempour Osaloo S.H., Maassoumi A.A., Murakami N., 2005. Molecular systematics of the Old World *Astragalus* (Fabaceae) as inferred from nrDNA ITS sequence data. *Brittonia*, 57: 367-381.
- Keefe Emmet B., (2008). Chronic Hepatitis B: Preventing, Detecting, and Managing Viral Resistance. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, volume 6, no. 3, Mar., pp. 268–74.
- Khan K. M., Rahim F., Wadood A., Kosar N., Taha M., Lalani S. (2014). Synthesis and molecular docking studies of potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors based on biscoumarin skeleton. *Eur. J. Med. Chem.* 81, 245–252.
- Kherraze M. E. H., Lakhdari K., Kherfi Y., Benzaoui.T., Berroussi.S., Bouhanna.M. et Sebaa A. (2010) : atlas floristique de la vallée de l’oued righ par écosystème, centre

## Références bibliographiques

---

- de recherche scientifique et technique sur les région aride « Omar Elbarnaoui »  
48 pages.
- Khoushab F, Yamabhai M (2010). Chitin research revisited. *Mar Drugs* 8:1988–2012.
- Kleessen B., Hartmann, L., and Blaut, M. (2001). Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J Nutr* 86, 291-300.
- Kobayashi H., Tanaka S., Suzuki J., Kiuchi Y., Shibata N., Suzuki S., and Okawa Y. (1997). Amended structure of side chains in a cell wall mannan from *Candida albicans* serotype A strain grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions: detection of the branched side chains corresponding to antigenic factor 4. *FEMS Microbiol Lett* 152: 235–242.
- Kodiralieva F.A., et Rakhmanberdyeva, R.K. (2011). Polysaccharides from seeds of plants of the family Fabaceae. *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 268-269.
- Kogan G., Kocher A (2007) Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest Sci* 109(1–3):161–165.
- Korakli M., Ganzle, M.G. and Vogel, R.F. (2002). Metabolism by Bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 958-965.
- Koshiishi H, Horikoshi E, Imanari T (1999) *Anal Biochem* 267:222.
- Kosyakov V. N., E. Veleshko Yakovlev N. G., Chernetskii V. N., Nifant'ev N. E. (2003). Water-Soluble Chitosans as Flocculants for Deactivation of Liquid Radioactive Wastes. *Radiochemistry*. Volume 45, Issue 4, pp 403–407.
- Kühtreiber W. M., Lanz, R. P., and Chick, W. L. (1999). Part III: Applications of cell encapsulated systems. In *cell encapsulation technology and therapeutics* (pp. 217–379).
- Kumar S, Godiya C.B, Siddhanta A.K. (2012). Carrageenan from *Sarconema scinaoides* (*Gigartinales*, *Rhodophyta*) of Indian waters. *Carbohydrate Polymers*, 87:1657–1662
- Labat J.N., (1996). Biogéographie, endémisme et origine des légumineuses papilionacées de Madagascar. *Biogéographie de Madagascar* : pp 95-108.
- Ladislava Misurcova Jana Orsavova and Jarmila Vavra Ambrozova (2015). Algal Polysaccharides and Health. In Ramawat, K. G., and Mérillon J. M., editors. *Polysaccharides*. Springer International Publishing, 2015.
- Lahaye M, Brunel M, Bonnin E (1997) Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvanlyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (*Ulvales*, *Chlorophyta*). *Carbohydrate Research*, 304:325–333.
- Lapasin R. and Priel S. (1999). *Rheology of Industrial Polysaccharides — Theory and Applications*: Aspen Publication, fifth edition. Maryland, U.S.A.
- Laroche C, Michaud P (2007). New developments and prospective applications for  $\beta$ -(1,3) glucans. *Recent Patents on Biotechnology*, 1:59–73.

- Lau J.M., McNeil M., Darvill A.G, Albersheim P., (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137:111–125
- Laurienzo P., (2010). Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Mar Drugs* 8(9):2435–2465
- Lee S, Choi H, Suh S, Doo IS, Oh KY, Choi EJ, Schroeder Taylor AT, Low PS, Lee Y (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol.*121:147–152.
- Levigne S., Ralet M-C., Thibault J-F. (2002) .Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design *Carbohydrate Polymers*.Volume 49, (2), Pages 145-153
- Lewis M. J. (1987). Physical properties of food and food processing systems (pp. 108–135).
- Li X-T, (2012). Mitochondrial Protection and Anti-Aging Activity of *Astragalus* Polysaccharides and Their Potential Mechanism.” *International Journal of Molecular Sciences*, volume 13, no. 12, Feb., pp. 1747–61.
- Li R., Chen W.C., Wang W.P., Tian W.Y., Zhang X.G., (2009). Extraction, characterization of *Astragalus* polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer. *Carbohydrate Polymers*.78, 738–742.
- Li S., Zhang Y., Zhao J. Jan (2007). Preparation and Suppressive Effect of *Astragalus* Polysaccharide in Glomerulonephritis Rats. *International Immunopharmacology*, volume 7, no. 1, pp. 23–28.
- Li X.Y. (2000). Immunomodulating components from Chinese medicines. *Pharmaceutical Biology*, 38 (SUPPL.), 33-40.
- Lin H, de Stanchina E, Zhou XK, Hong F, Seidman A, Fornier M, Xiao WL, Kennelly EJ, Wesa K,Cassileth BR, Cunningham-Rundles S (2010). Maitake beta-glucan promotes recovery of leukocytes and myeloid cell function in peripheral blood from paclitaxel hematotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 59(6):885–897.
- Linné, C. (1753). *Species plantarum*. Decimra, Reformata eds. Holmiae, Stockholm
- Liston A., Wheeler J.A., (1994). The phylogenetic position of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from the chloroplast genes rpoC1 and rpoC2. *Biochemical Systematics and Ecology*.22: 377-388.
- Liu J., Willfo S. And Xu C., (2015). A review of bioactive plant polysaccharides. Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, volume 5: 31 – 61.
- Liu C., Liu Q., Sun J., Jiang B. and Yan J., (2014). Extraction of water-soluble polysaccharide and the antioxidant activity from *Semen cassia*. *Journal of food and drug analysis*. Article in press, 1-8.
- Liyanage S., Abidi, N., Auld, D., Moussa, H. (2015). Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (*Cyamopsis tetragonolobus* L.). *Industrial Crops and Products*, 74, 388-396.
- Lock J.M., Simpson K. (1991). Legumes of West Asia, a checklist. Royal Botanical Gardens, Kew. 263 pp.

- Long Y., Tan D.Y, Baskin C.C., Baskin J.M. (2012). Seed dormancy and germination characteristics of *Astragalus arpilobus* (Fabaceae, subfamily Papilionoideae), a central Asian desert annual ephemeral. *South African Journal of Botany*. 83: 68-77.
- Longland JM, Fry SC, Trewavas AJ (1989). Developmental control of apiogalacturonan biosynthesis and UDP-apiose production in a duckweed. *Plant Physiol* 90: 972-976
- Lu L., Wang D-T., Shi Y., Yin Y., Wei L-B., Zou Y-C., Huang B., Zhao Y., Wang M., Wan H., Li C-J., Diao J-X. (2013). *Astragalus* Polysaccharide Improves Muscle Atrophy from Dexamethasone- and Peroxide-Induced Injury in Vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, volume 61, Oct., pp. 7-16.
- Lyons L. et Nambiar D. (2005). Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH. 1ère édition Catie. 60 pages.
- Macfarlane G.T. and McBain, A.J. (1999). The human colonic microbiota. In *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*, G.R. Gibson and M. Roberfroid, editors, Kluwer Academic Publishers, London, pp. 1-26.
- Mallett B.V. McCleary and N.K (1987). Matheson, *Phytochemistry*, 26 1889.
- Malves J-F. Les plantes adaptogenes. (2008). Google Scholar, [http://hippocrates.com/metabase/web\\_site/1/contenu/public/pdf/memoires/2012/mai/les\\_plantes\\_adaptogenes.pdf](http://hippocrates.com/metabase/web_site/1/contenu/public/pdf/memoires/2012/mai/les_plantes_adaptogenes.pdf).
- Mantovani M.S, Bellini M.F, Angeli J.P.F, Oliveira R.J, Silva A.F, Ribeiro LR (2008).  $\beta$ -Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. *Mutat Res* 658:154-161
- Marshall J.S (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology*. 4:787-99.
- Matsunaga T, Ishii T, Matsumoto S, Higuchi M, Darvill AG, Albersheim P, O'Neill MA (2004). Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiol* 134:339-351.
- Mathur N.K. (2011). *Industrial galactomannan polysaccharides*. CRC Press. 187 pages.
- Mao W.J., Fang F, Li HY, Qi XH, Sun HH, Chen Y, Guo S.D. (2008). Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*. *Carbohydrate Polymers*. 74:834-839.
- McCleary B.V. and Matheson, N.K (1976). Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry*. Volume 15, Pages 43-47.
- McCleary B.V. and Matheson, N.K. (1974).  $\alpha$ -D-Galactosidase activity and galactomannan and galactosylsucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. *Phytochemistry*. Volume 13. Pages 1747-1757.
- McCleary B.V. (1983). Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- $\beta$ -mannanase. *Phytochemistry*, 22 649.
- McCleary B.V., *Carbohydr. Res.*, 101 (1982). Purification and properties of a  $\beta$ -D-mannoside mannohydrolase from guar *Carbohydrate Research*. Volume 101, Issue 1, 16 February 1982, Pages 75-92.

## Références bibliographiques

---

- McIntosh M, Stone BA, Stanisich VA (2005): Curdlan and other bacterial (1,3)-beta-D-glucans. *Applied Microbiology Biotechnology*, 68(2):163–173
- McLaughlin H. P., Motherway M. O., Lakshminarayanan B., Stanton C., Paul Ross R., Brule J., (2015). Carbohydrate catabolic diversity of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 109–121
- McNeil M, Darvill AG, Albersheim P (1980). Structure of plant cell walls: X Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol* 66:1128–1134.
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem* 53:625–663.
- McCulloch M , See C, Shu X.J, Broffman M, Kramer A, Fan W.Y, Gao J, Lieb W, Shieh K, Colford J.M. Jr, 2006. *Astragalus*-based Chinese herbs and platinum-based
- Mei C-l., Chen Z-J., Liao Y-H, Wang Y-F, Peng H-Y, Chen Y. (2007). Interleukin-10 Inhibits the down-Regulation of ATP Binding Cassette Transporter A1 by Tumour Necrosis Factor-Alpha in THP-1 Macrophage-Derived Foam Cells.” *Cell Biology International*, volume 31, no. 12, pp. 1456–61.
- Medjekal S. and Bousseboua H. (2016). Effects of season on potential nutritive value, methane production and condensed tannin content of *Astragalus gombo*. *Livestock Research for Rural Development*, 28 (12), 1.
- Medjekal S., Ghadbane, M., Bodas, R., Bousseboua, H., and López, S. (2016). Volatile fatty acids and methane production from browse species of Algerian arid and semi-arid areas. *Journal of Applied Animal Research*, 1-6.
- Mestechkina N.M., Anulov, O.V., Smirnova, N.I., and Shcherbukhin, V.D. (2000). Composition and structure of a galactomannan macromolecule from seeds of *Astragalus lehmannianus bunge*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36 (5), 502-506.
- Meyer K., Palmer J. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107, 629–634.
- Miller I.J (1996). Alginate composition of some New Zealand brown seaweeds. *Phytochemistry* 41:1315–1317
- Mingliang J., Zhao K., Qingsheng H. and Peng S. Structural Features and Biological Activities of the Polysaccharides from *Astragalus Membranaceus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, volume 64, Mar. 2014, pp. 257–66.
- Misurcova L, Skrovankova S, Samek D, Ambrozova J, Machu L (2012). Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition. *Adv Food Nutr Res* 66:75–145.
- Miura NN, Adachi Y, Yadomae T, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. 2003. Structure and biological activities of beta-glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 47: 173–182.
- Mohnen D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11:266–277
- Monsigny M., Petit, C., and Roche, A.-C. (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry*, 175 (2), 525-530.

- Montoya S, Sánchez O J, Levin L (2013) Polysaccharide production by submerged and solid-state cultures from several medicinal higher basidiomycetes. *Int J Med Mushrooms* 15(1):71–79
- Molnár A., Sonkoly J. Lovas - Kiss A. , Fekete R., Takács A., Somlyay L. and Török P. (2015). Seed of the threatened annual legume, *Astragalus contortuplicatus*, can survive over 130 years of dry storage. *Preslia* 87: 319–328.
- Moon RJ, Martini A., Nairn J, Simonsen J, Youngblood J (2011) Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem Soc Rev.* 40:3941–3994.
- Moreira LR, Filho EX (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology Biotechnology*, 79:165–178.
- Morris V. J. and Belton, P. S. (1980). Specific ion effects in lota-carrageenate gels, *Journal of the chemical society*, 20, 983-984.
- Mukerjee P, Mysels KJ: Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems (NSRDS-NBS 36): Drugs & the pharmaceutical sciences, volume 122; 1971.
- Mulimani VH, Prashanth SJ (2002). Investigating plant galactomannans. *Biochem Mol Biol Educ* 30(2):101–103
- Muschin T., and Yoshida, T. (2012). Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1893-1898.
- Mulloy B, Linhardt RJ (2001) Order out of complexity – protein structures that interact with heparin. *Curr Opin Struct Biol* 11:623–628.
- Nakamura A, Furuta H, Maeda H, Takao T, Nagamatsu Y (2002). Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:1301–1313.
- Niknam V., and Lisar, Y.S. (2004). Chemical composition of *Astragalus*: Carbohydrates and mucilage content. *Pakistan Journal of Botany*, 36 (2), 381-388.
- Nielson D. B., (1978): The economic impact of poisonous plants on the range livestock industry in the 17 western states. *J. Range Mana*, 31 : 325- 328.
- Niu Y., Wang, H., Xie, Z., Whent, M., Gao, X., Zhang, X., Zou, S., Yao, W., et Yu, L. (2011). Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao. *Food Chemistry*, 128 (3), 620-626.
- Ochoa-Villarreal M, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro I, Martinez-Tellez M (2012) Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. In: De Souza Gomes A. *Polymerization*, InTech,
- Okawa Y. and Goto K. (2006) Antigenicity of cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida stellatoidea* cultured at high temperatures in BACTEC medium. *Biol Pharm Bull* 29: 1723–1727.
- Ohno N (2003). Chemistry and biology of angitis inducer, *Candida albicans* water-soluble mannoprotein-beta-glucan complex (CAWS). *Microbiol Immunol Review.*, 2003, 47 (7):479-90.

- Olennikov D.N., and Rokhin, A.V. (2008). Polysaccharides of Fabaceae. I. Galactomannan of *Astragalus sericeocanus* seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, 44 (6), 685-687.
- Olennikov D.N., and Rokhin, A.V. (2009). Polysaccharides of Fabaceae. II. Galactomannan from *Astragalus danicus* seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, 45 (3), 297-299.
- Olennikov D.N., and Rokhin, A.V. (2010). Fabaceae polysaccharides. III. Galactomannan from *Astragalus cicer* seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, 46 (2), 165-168.
- Olennikov D.N., and Rokhin, A.V. (2011). Polysaccharides of Fabaceae. VI. Galactomannans from seeds of *Astragalus alpinus* and *A. tibetanus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47 (3), 343-346.
- Olusola B.A., Amos O., Scholastica O.A., Catherine J.O., Idowu A.A., Miriam F.A., (2015). Protective Effect of Ethanolic Extract of *Crassocephalum Rubens* Leaves on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage in Rats. *World Journal of Pharmaceutical Research*, volume 4, no. 09, pp. 156–168.
- Osorio S, Castillejo C, Quesada MA, Medina-Escobar N, Brownsey GJ, Suau R, Heredia A, Botella MA, Valpuesta V (2008). Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant J* 54:43–55.
- Otterlei M., Østgaard K., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O., Soon-Shiong P. and Espevik, T. (1991). Induction of Cytokine Production from Human Monocytes Stimulated with Alginate. *Journal of Immunotherapy*. Volume 10 - (4).
- Ovodova RG, Golovchenko VV, Shashkov AS, Popov SV, Ovodov YS (2000). Structural studies and physiological activity of lemnan, a pectin from *Lemna minor* L. *Russ J Bioorg Chem* 26:669 676 Palumbo, Emilio. New Drugs for Chronic Hepatitis B: A Review. *American Journal of Therapeutics*, volume 15, no. 2, 2008, pp. 167–172.
- Ozenda P., (2004). *Flore du Sahara*. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 622 pages.
- O'Neill MA, York WS (2003). The composition and structure of plants primary cell walls. In: Rose JKC. *The plant cell wall*. Blackwell, Oxford, pp 1–54
- Pal A., Das D., Kumar Sarkar A., Ghorai S., Das R. and Pal S. (2015). Synthesis of glycogen and poly (acrylic acid)-based graft copolymers via ATRP and its application for selective removal of Pb<sup>2+</sup> ions from aqueous solution. *European Polymer Journal*, volume 66: 33-46
- Palaniraj A, Jayaraman V (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *J Food Eng* 106:1–12
- Palframan R. J., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2002). Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates in vitro. *Anaerobe* 8, 287-292.
- Paul R. S (2005). *Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH*. Édition révisée. 60 pages.
- Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238:627–642

- Peaucelle A, Braybrook S, Hofte H (2012). Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. *Frontiers in Plant Science*. 3:121.
- Pena MJ, Darvill AG, Eberhard S, York WS, O'Neill MA (2008). Moss and liverwort xyloglucans contain galacturonic acid and are structurally distinct from the xyloglucans synthesized by hornworts and vascular plants. *Glycobiology* 18:891–904
- Pereira MS, Melo FR, Mourao PAS (2002). Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology* 12:573–580
- Persin Z., Stana-Kleinschek, K., Foster, T.J., van Dam, J.E.G., Boeriu, C.G., Navard, P., (2011). Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care. *Carbohydrate Polymers*. 84 (2011) 22–32.
- Persoz.B., (1969). "La rhéologie", Monographie Masson et Cie.
- Perrin S., Fougnyes, C., Grill, J., Jacobs, H., and Schneider, F. (2002). Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* . 48, 759-763
- Petera B., Delattre, C., Pierre, G., Wadouachi, A., Elboutachfai, R., Engel, E., Poughon, L., Michaud, P., et Fenoradosoa, T.A. (2015). Characterization of arabinogalactan-rich mucilage from *Cereus triangularis* cladodes. *Carbohydrate Polymers*, 127, 372-380.
- Pierre G., Graber, M., Rafiliposon, B.A., Dupuy, C., Orvain, F., de Crignis, M., et Maugard, T. (2012). Biochemical Composition and Changes of Extracellular Polysaccharides (ECPS) Produced during Microphytobenthic Biofilm Development (Marennes-Oléron, France). *Microbial Ecology*, 63 (1), 157-169.
- Pierre G., Zhao, J.-M., Orvain, F., Dupuy, C., Klein, G.L., Graber, M., et Maugard, T. (2014). Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes-Oléron, France). *Journal of Sea Research*, 92, 26-35.
- Pierre and Françoise, (2009). [www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements](http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements).
- Podlech D., (1986). Taxonomic and phytogeographical problems in *Astragalus* of the Old World and South West Asia. *Proc Roy Soc*, 89: 37-43.
- Podlech D (1983). Zur Taxonomic und Nomenklatur der Tragacanthoiden Astragali. *Mitt Bot Staats* 19: 1-23.
- Podlech D., 1982. Neue Aspekte zur Evolution und Gliederung der Gattung *Astragalus* L. *Mitt. Staatssamml. München*, 18: 359-378.
- Pollard M.A., Kelly R., Fischer P.A., Windhab E.J., Eder B., Amado R. (2008). Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples *Food Hydrocolloids* 22, 1596–1606
- Popper ZA, Michel G, Herve C, Domozych DS, Willats WGT, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB (2011) Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*. 62:567–590.

## Références bibliographiques

---

- Prado B.M., Kim S., Ozen B.F., Mauer L.J., (2005). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 2823–2829.
- Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK (2014) Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. Carbohydrate Polymers 105:97–112
- Prajapati VD, Jani GK, Khanda SM (2013) Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. Carbohydrate Polymers. 95(1) :540–549.
- Quezel P. et Santa S., 1962-1963 - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS Paris. Volume 1 et 2, 1170 p.
- Ramrani P., Gaudier E., Bingham M., van Bruggen P., Tuohy K.M., Gibson G.R. (2010). Prebiotic effect of fruit and vegetable shots containing Jerusalem artichoke inulin: A human intervention study. British Journal of Nutrition. Volume 104: pp 233–240.
- Ramawat K. G., and Mérillon J. M., (2015). Polysaccharides. Springer International Publishing.
- Ratnayake S., Beahan, C.T., Callahan, D.L., Bacic, A. (2013). The reducing end sequence of wheat endosperm cell wall arabinoxylans. Carbohydrate Research, 386:23–32
- Rather L.J., and Shahid-UI-Islam, M.F., (2015). Acacia nilotica (L.): A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2, 12-30.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., 2000. Biologie végétale. 6ème Edition de boeck
- Ravi Kumar M.N.V (2000). A review of chitin and chitosan applications. React Funct Polym 46:1–27
- Ray B, Loutelier-Bourhis C, Lange C, Condamine E, Driouch A, Lerouge P (2004). Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterisation of a novel xyloglucan motif. Carbohydrate Research, 339:201–208
- Rehm B.H.A. Valla S. Bacterial alginates: biosynthesis and applications (1997). Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 48, (3), pp 281–288.
- Rehm B.H.A, Winkler U.K. (1996). Alginatbiosynthese bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Azotobacter vinelandii*. Molekularbiologie und Bedeutung. Biospektrum 2: 31.
- Reid J.S.G., and Meier, H. (1972). The function of the aleurone layer during galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) and lucerne (*Medicago sativa* L.): A correlative biochemical and ultrastructural study Planta, 106 44.
- Reid J.S.G., and Meier, H. (1970). Chemo-taxonomic aspects of the reserve galacto-mannans in leguminous seeds. Pflanzenphysiol, 62 89.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide related signaling. Phytochemistry 57:929–967
- Rinaudo M. Moroni A. (2009), Rheological behavior of binary and ternary mixtures of polysaccharides in aqueous medium. Food Hydrocolloids, 23, (7), pages 1720-1728.

- Rios J.L., and Waterman, P.G. (1997). A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*. *Phytotherapy Research*, 11 (6), 411-418.
- Rioux LE, Turgeon SL, Beaulieu M (2007). Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers* 69:530–537.
- Roach PJ (2002). Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med* 2:101–120
- Roberfroid M., Gobson G.R., Hoyles L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl, B., Szajewska H. and Stahl B. (2011). Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104, S1–S63.
- Roberts G.A.F (1992) Structure of Chitin and Chitosan. *Chitin Chemistry*, 1st edition; Chitin Chemistry pp 1-53.
- Ross-Murphy and Simon B., (1994). *Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers*. Boston, MA: Springer US.
- Round AN, Rigby NM, MacDougall AJ, Morris VJ (2010). A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, 345:487–497.
- Rowland, I.R. and Mallett, A.K. (1990). The effect of diet on mammalian gut flora and its metabolic activities. *Critical Review in Toxicology*. 16, 31-103.
- Rubinstein M, Dobrynin AV: Solutions of associative polymers. *Trends in Polymer Science* (Cambridge, United Kingdom) 1997, 5(6):181-186.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Microbiol* 91, 878-887.
- Rydberg P.A., (1929). Phylogenetic Relationships within North American *Astragalus* L. (Fabaceae). *Astragalanae*. *North American Flora* 24: 251-462.
- Sanderson M.J., Wojciechowski M.F., 1996. Diversification rates in a temperate legume clade: Are there so many species of *Astragalus* (Fabaceae) .*American Journal of Botany*, 83: 1488-1502.
- Sanderson M.J., Doyle J.J., (1993). Phylogenetic relationships in North American *Astragalus* (Fabaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation. *Syst Bot*, 18: 395-408.
- Sanderson M.J. (1991). Phylogenetic relationships within North American *Astragalus* (Fabaceae). *Syst Bot*, 16: 414-430.
- Sartal CG, Alonso MCB, Barrera PB (2011). Application of seaweeds in the food industry. In: Kim SK (Ed). *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycolgy*, 1st edn. Wiley, Chichester, pp 522–531.
- Scheller HV, Ulvskov P (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 61:263–289.
- Scherson R.A., Vidal R., Sanderson M.J. (2008). Phylogeny, biogeography and rates of diversification of New World *Astragalus* (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations. *Am J Bot*, 95: 1030-1039.
- Secouard S., Grisel M., Malhiac C. (2007). Flavour release study as a way to explain xanthan–galactomannan interactions *Food Hydrocolloids* 21 1237–1244
- Sen A.K.S.R, Das A.K., Banerji N., Siddhanta A.K., Mody K.H., Ramavat B.K., Chauhan V.D., Vedasiromoni J.R. and Ganguly DK (1994). A new sulfated

- polysaccharide with potent blood anti-coagulant activity from the red seaweed *Grateloupia indica*. *Int J Biol Macromol* 16:279–280.
- Shabani, H., Askari, G., Jahanbin, K., and Khodaeian, F. (2016). Evaluation of physicochemical characteristics and antioxidant property of *Prunus avium* gum exudates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 436-441.
- Shahidi and Zhong, (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 18.
- Shanmugam M, Mody KH, Ramavat BK, Murthy ASK, Siddhanta AK (2002). Screening of Codiacean algae (Chlorophyta) of the Indian coasts for blood anticoagulant activity. *Indian JMar Sci.* 31:33–38.
- Silva D.D, Rapior S, Hyde KD, Bahkali AH (2012). Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Divers* 56(1):1–29
- Singh R. M., Kaur N. and Kennedy J. F., (2015). Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. *Carbohydrate Polymers*, volume 123: 190-207.
- Singh R.S, Mishra S, Kumar N (2010). Optimization of  $\alpha$ -amylase production on agriculture byproduct by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Res J Pharm BiolChem Sci.* 1:867.
- Singh R.S, Saini GK, Kennedy JF (2008). Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73:515–531.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., et Lamuela-Raventós, R.M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sioufi, A., Percheron, F. and Courtois, J.E (1970). Nucleoside-diphosphate-oses et métabolisme glucidique au cours de la germination chez le fenugrec. *Phytochemistry*, 9 991.
- Siwicka D., Różeńska E.S., Boder P. (2011). Immunotropic and Anti-Tumor Effects of Plant Adaptogens. III. *Astragalus* (Fabaceae). *Centr Eur Journal Immunol*, volume 36, no. 2, pp. 104–107.
- Smidsrød O. Painter T. (1973). Effect of periodate oxidation upon the stiffness of the alginate molecule in solution. *Carbohydrate Research*. Volume 26, (1), Pages 125-132.
- Smimova N.I., Lobanova I.E. and Anulov O.V., *Rast. Resursy*, 34 (1998) 68.
- Smirnova, N., Mestechkina, N., and Sherbukhin, V. (2004). Fractional isolation and study of the structure of galactomannan from sophora (*Styphnolobium japonicum*) seeds. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40 (5), 517-521.
- Smiricky-Tjardes, M. R., Flickinger, E. A., Grieshop, C. M., Bauer, L. L., Murphy, M. R., and Fahey, G. C. (2003). In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. *J Anim Sci* 81, 2505-2514.
- Smith F., *Am J* (1948). *Plant Gums and Mucilages*. *Chem. Soc*, 70, 3249.
- Soon-Shiong P., Heintz, R. E., Merideth, N., Yao, Q. X., Yao, Z., Zheng, T. (1994). Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *The Lancet*, 343, 950–951.
- Srivastava, M. and Kapoor, V.P. (2005). Seed galactomannans: An overview. *Chemical Biodiversity*, 2, 295–317.

## Références bibliographiques

---

- Stevenson TT, Darvill AG, Albersheim P (1988). Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II. *Carbohydrate Research*, 182:207–226.
- Sterling J. D., Quigley H. F., Orellana A., Mohnen D. (2001). The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme (-1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol.* 127, 360–371. doi:10.1104/pp.127.1.360
- Stokke B.T., Brant D. A. (1990). The reliability of wormlike polysaccharide chain dimensions estimated from electron micrographs. *Biopolymers*, volume 30, Issue 13-14. Pages 1161–1181
- Streusand VJ, Bjork I, Gettins PGW, Petitou M, Olson ST (1995) Mechanism of acceleration of antithrombin-proteinase reactions by low affinity heparin. *J Biol Chem* 270:9043–9051
- Sun, L.-M., Wang, X.-L., Deng, W.-L., Ding, L.-S., and Peng, S.-L. (2011). Chemical constituents from *Astragalus ernestii*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9 (1), 38-41.
- Tada R., Nagi-Miura N., Adachi Y., and Ohno N. (2008). The influence of culture conditions on vasculitis and anaphylactoid shock induced by fungal pathogen *Candida albicans* cell wall extract in mice. *Microb Pathog* 44: 379–388.
- Tanaka, R., Hatakeyama, T. and Hatakeyama, H. (2004). Formation of locust bean gum hydrogel by freezing thawing. *Polymer International*, 45, 118–126.
- Tang W., Eisenbrand G., (1992). *Chinese Drugs of Plant Origin - Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg, 737, 39-8
- Thibault J.F., Guillon F., Rombouts F.M., (1991). *The chemistry and. technology of pectin*. Academic Press, San Diego, California, 119-133.
- Thombare, N., Jha, U., Mishra, S., and Siddiqui, M.Z. (2016). Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 361-372.
- Teitelbaum J.E. and Walker, W.A. (2002). Nutritional impact of pre and probiotics as protective gastrointestinal organism. *Annual Review of Nutrition*, 22, 107–138.
- Tian QE, De Li H, Yan M, Cai HL, Tan QY and Zhang WY. Effects of *Astragalus* Polysaccharides on P-Glycoprotein Efflux Pump Function and Protein Expression in H22 Hepatoma Cells in Vitro.” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, volume 12, no. 1, 2012, p. 1.
- Tin M.M, Cho C.H, Chan K, James A.E, Ko J.K, (2007). *Astragalus saponins* induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft. *Vol* 28:1347-55p. *Carcinogenesis*
- Tookey H.L., Lohmar R.L., Wolff I.A. and Jones Q., *Agr. Food Chem.*, 10 (1962) 131.
- Torrey J., Gray A., 1838. *Tribe Astragaleae*. *A Flora of North America*, 1: 328-353.
- Tournefort J.P (1700). In Jacques Delille (1803). *Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle, appliquée aux arts, principalement à l'agriculture, à l'économie rurale et domestique*, Volume 2.
- Trease G.E. (1983). *Pharmacognosy*. Bailliere Tindall, London, pp 358~359
- Tsujisaka Y. and Mitsuhashi M. (1993), *pullulan*. *Polysaccharides and their derivatives* 3rd Edition. Pages 642.

- Unrau A.M. and Choy, Y.M. (1970). *Carbohydrate Research*, 14, 151.
- Van der Meulen R., Avonts, L., and De Vuyst, L. (2004). Short fractions of oligofructose preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Appl Environ Microbiol* 70, 1923-1930.
- Vander P., Vårum K.M., Domard A., El Gueddari N.E, Moerschbacher B. M. (1998). Comparison of the Ability of Partially *N*-Acetylated Chitosans and Chitooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves. *Plant Physiol.* (1998) 118: 1353–1359.
- Vendruscolo, C.W., Ferrero, C., Pineda, E.A.G., Silveira, J.L.M., Freitas, R.A., Jiménez-Castellanos, M.R., and Bresolin, T.M.B. (2009). Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: Effect of drying method. *Carbohydrate Polymers*, 76 (1), 86-93.
- Verbeken D., Dierckx S., Dewettinck K., (2003). Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology Biotechnology*. (2003) 63:10–21
- Vardakou Maria, Claire Dumon, James W. Murray, Paul Christakopoulos, David P. Weiner, Nathalie Juge, Richard J. Lewis, Harry J. Gilbert, et James E. Flint. (2008). Understanding the Structural Basis for Substrate and Inhibitor Recognition in Eukaryotic GH11 Xylanases. *Journal of Molecular Biology* 375 (5): 1293-1305.
- Venkataraju M.P., Gowda D.V., Rajesh K.S., Shiva K.H., (2007). Xanthan and locust bean gum (from *Ceratonia siliqua*) matrix tablets for oral controlled delivery of propranolol hydrochloride *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2, 239–248.
- Venter C., Pereira B, Grundy J, Clayton CB, Roberts G, Higgins B, Dean T. (2006). Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.*117 (5):1118-24.
- Vernazza C.L., Rabiou, B.A. and Gibson, G.R. (2006). Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: Introduction to prebiotic. In *Prebiotics: Development, Application*, G.R. Gibson, R.A. Rastall, editors, John Wiley, and Sons, Ltd., West Sussex, pp. 1-28.
- Varmaa A.J., Deshpandea S.V., Kennedy J.F. (2004). Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review A.J. Varmaa, S.V. Deshpandea, J.F. Kennedy. *Carbohydrate Polymers* 55 77–93.
- Viebke C., Assaf, S.A., and Phillips, G. (2014). Food hydrocolloids and health claims. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 4, 101-114.
- Vieira M.C. and Gil, A.M. (2005). A solid-state NMR study of locust bean gum galactomannan and Konjac glucomannan gels. *Carbohydrate Polymers*, 60, 439-448.
- Wang H., Zhang X., Li Y., Chen R., Ouyang S., Sun P., Pan L., Ren H. and Yang B., (2014b). Antitumor activity of a polysaccharide from longan seed on lung cancer cell line A549 *in vitro* and *in vivo*. *Tumor Biol.* volume 35: 7259-7266
- Wang Y-F., Yang X-F., Cheng B., Mei C-L, Li Q-X, Zeng, Q-T, Liao Y-H, Liu K., and Xiao H. (2010). Protective effect of *Astragalus* polysaccharides on ATP binding

- cassette transporter A1 in THP-1 derived foam cells exposed to tumor necrosis factor-alpha. *Phytotherapy Research*. 24: 393–398.
- Wang T., Sun Y., Jin L., Xu Y., Wang L. Ren T., Wang K. (2009). Enhancement of non-specific immune response in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) by *Astragalus membranaceus* and its polysaccharides *Fish & Shellfish Immunology*. Volume 27, Issue 6, Pages 757-762.
- Wang S.C., Shan J.J., Wang Z.T., Hu Z.B. (2006). Isolation and Structural Analysis of an Acidic Polysaccharide from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge. *Plant Biol*. 48 1379–1384.
- Wang J., Ito H., Shimura K., (1989). Enhancing Effect of Antitumor Polysaccharide from *Astragalus* or *Radix hedysarum* on C3 Cleavage Production of Macrophages in Mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*, Volume 51 No. 3 P 432-434.
- Watrous K.M, Cane J.H (2011). Breeding biology of the thread stalk milkvetch, *Astragalus filipes* (Fabaceae), with a review of the genus. *American Midland Naturalist*; 165(2):225–240.
- Willats W.G.T, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47:9–27.
- Williams P.A., and Phillips, G.O. (2009). Introduction to food hydrocolloids. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*, 1-22.
- Wojciechowski M.F. (2005). *Astragalus* (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective. *Brittonia*, 57: 382-396.
- Wojciechowski M.F., Sanderson M.J., Hu J.M. (1999). Evidence on the monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL intron data. *Syst Bot*, 24: 409-437.
- Wojciechowski M.F., Sanderson M.J., Baldwin B.G., Donoghue M.J. (1993). Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Am J Bot*, 80, 711-722 .
- Wondraczek H. and Heinze, T. (2015). Cellulosic Biomaterials. In In Kishan Gopal Ramawat, K. G. and Mérillon, J-M. *Polysaccharides Bioactivity and Biotechnology*. 299-322.
- Wu A.M., Rihouey C., Seveno M., Hornblad E., Singh S.K., Matsunaga T, Ishii T, Lerouge P, Marchant A (2009). The Arabidopsis IRX10 and IRX10-LIKE glycosyltransferases are critical for glucuronoxylan biosynthesis during secondary cell wall formation. *Plant J*. 57:718–731
- Xu H-S., Wu Y-W., Xu S-F. Sun H-X., Chen F-Y., Yao L. (2009). Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha* *Journal of Ethnopharmacology*. 125, (2), Pages 310-317
- Yan F., Zhang Q.Y., Jiao L., Han T., Zhang H., Qin L.P., Khalid R. (2009). Synergistic Hepatoprotective Effect of Schisandrae Lignans with *Astragalus* Polysaccharides on Chronic Liver Injury in Rats. *Phytomedicine*, volume 16, no. 9, pp. 805–13.
- Yan H., Xie Y., Sun S., Sun X., Ren F., Shi Q., Wang S., Zhang W., Li X., Zhang J. (2010). Chemical Analysis of *Astragalus Mongholicus* Polysaccharides and

- Antioxidant Activity of the Polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, volume 82, no. 3, pp. 636–40.
- Yang L, Zhang L-M (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers* 76 (3): 349–361.
- Yang M., Qian X-H., Zhao, D-H., Fu S-Z. (2010). Effects of *Astragalus* polysaccharide on the erythroid lineage and microarray analysis in K562 cells *Journal of Ethnopharmacology* 127 (2010) 242–250
- Ye H., Wang K., Zhou C., Liu J. and Zeng X. (2008). Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassumpallidum*. *Food Chemistry*. Volume 111, (2), Pages 428-432
- York W.S and O'Neill M.A. (2008). Biochemical control of xylan biosynthesis – which end is up? *Curr Opin Plant Biol.* 11:258–265.
- Yu S.-Y. OuYang H-T., YangXiao J-Y. TingYang L.H., (2007). Subchronic toxicity studies of *Radix Astragali* extract in rats and dogs. *Journal of Ethnopharmacology* (110), Issue 2, 21, Pages 352-355
- Yuan S.L., Piao XS, Li D. F., Kim S.W., Lee H.S, Guo P.F. (2006). Effects of Dietary *Astragalus* Polysaccharide on Growth Performance and Immune Function in Weaned Pigs. *Animal Science*, volume 82, no. 04.
- Zandleven J, Beldman G, Bosveld M, Schols HA, Voragen AGJ (2006). Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase. *Carbohydrate Polymers*, 65:495–503.
- Zanoni S, Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Rossi M, Matteuzzi D. (2008). Growth kinetics on oligo- and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains. *J Appl Microbiol.* ; 105(5):1266-76.
- Zarre S. and N. Azani. (2013). Perspectives in taxonomy and phylogeny of the genus *Astragalus*: a review. *Proceedings. Biological Sciences* 3: 1–6.
- Zarre M.S., Podlech D., (1997). Problems in the taxonomy of tragacanthic *Astragalus*. *Sendtnera*, 4: 243-250.
- Zarre-Mobarakeh S. (2000). Systematic revision of *Astragalus* sect. *Adiaspastus*, sect. *Macrophyllium* and sect. *Pterophorus* (Fabaceae). *Englera*, 18: 1-219.
- Zeng WC, Zhang Z, Jia LR (2014). Antioxidant activity and characterization of antioxidant polysaccharides from pine needle (*Cedrus deodara*). *Carbohydrate Polymers* 108(8), 58.
- Zhang Y.W., Wu C.Y, Cheng J.T. (2007). Merit of *Astragalus* Polysaccharide in the Improvement of Early Diabetic Nephropathy with an Effect on mRNA Expressions of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B in Renal Cortex of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.” *Journal of Ethnopharmacology*, volume 114, no. 3, pp. 387–92.
- Zhang J., Tang, Q., Zimmerman-Kordmann, M., Reutter, W., and Fan, H. (2002). Activation of B-lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Life Sciences*, 71, 623–638.

- Zhang M., Cui, S. W., Cheung, P. C., and Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 4–19.
- Zhang M., Zhu, L., Cui, S. W., Wang, Q., Zhou, T., and Shen, H. (2011). Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide–protein complexes from *Pleurotus geesteranus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 5–12.
- Zhang B., Deng Z., DanRamdath D., TangY., Peter X., RonghuaLiu C., Liu Q., Tsao R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase *Food Chemistry*. Volume 172, Pages 862-872.
- Zheng Y.J., Zhou, B., Song Z.F., Li L., Wu. J., Zhang R.Y., Tang, YQ. (2013). Study of *Astragalus Mongholicus* Polysaccharides on Endothelial Cells Permeability Induced by HMGB1. *Carbohydrate Polymers*, volume 92, no. 1, Jan. 2013, pp. 934–41.
- Zhong RQ, Ye ZH (2009). Secondary cell walls. In: eLS. Wiley, Chichester. <http://www.els.net>.
- Zhou X. L., Liang J. S., Zhang Y., Zhao H. D., Guo Y., Shi S. Y. (2015). Separation and purification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Polygonatum odoratum* by stepwise high-speed counter-current chromatography combined with Sephadex LH-20 chromatography target-guided by ultrafiltration-HPLC screening. *J. Chromatography. B* 985, 149–154.
- Zhu Z-Y, Liu R-Q., Si C-L., Zhou, F., Wang Y-X, Ding, L.N, Jing C., Liu, A-J, Zhang, Y-M. (2011). Structural Analysis and Antitumor Activity Comparison of Polysaccharides from *Astragalus*.” *Carbohydrate Polymers*, volume 85, no. 4, July 2011, pp. 895–902.
- Zong A., Cao H., Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1395–1410.

# **ANNEXES**

## **TABLE DES ANNEXES**

**ANNEXE 1** : Publication dans une revue à comité de lecture.

**ANNEXE 2** : Participation à des congrès nationaux et internationaux.

**ANNEXE 1 : Publication dans une revue à comité de lecture.**

**Chouana T.**, Pierre G., Vial C., Gardarin C., Wadouachi A., Cailleu D., Lecerf D., Boual Z., Ould El Hadj M.D., Michaud P., Delattre C. (2017). Structural characterization and rheological properties of a galactomannan from *Astragalus Gombo* bunge seeds harvested in Algerian Sahara. Carbohydrate Polymers. 175: 387–394. (IF: 4, 81)

Boual Z., **Chouana T.**, Kemassi A., Oudjana H., Daddi Bouhoun M., Michaud P., Ould El Hadj M.D (2015). Étude physicochimique et biologique des polysaccharides hydrosolubles de *plantago notata lagasca* (Plantaginaceae). Phytothérapie. 13 : 396–402



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol)

## Structural characterization and rheological properties of a galactomannan from *Astragalus gombo* Bunge seeds harvested in Algerian Sahara



T. Chouana<sup>a,b</sup>, G. Pierre<sup>b</sup>, C. Vial<sup>b</sup>, C. Gardarin<sup>b</sup>, A. Wadouachi<sup>c</sup>, D. Cailleu<sup>c</sup>, D. Le Cerf<sup>d</sup>, Z. Boual<sup>a</sup>, M.D. Ould El Hadj<sup>a</sup>, P. Michaud<sup>b</sup>, C. Delattre<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Kasdi Merbah-Ouargla, Laboratoire Protection des Écosystèmes en Zones Arides et Semi-arides, 30000 Ouargla, Algeria, Algeria

<sup>b</sup> Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> Laboratoire LG2A – CNRS UMR 7378, UFR des Sciences, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu 80039 Amiens Cedex, France

<sup>d</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, PBS, 76000 Rouen, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 April 2017

Received in revised form 20 July 2017

Accepted 1 August 2017

Available online 7 August 2017

#### Keywords:

*Astragalus*

Galactomannan

Polysaccharide

Rheological analysis

### ABSTRACT

A water soluble polysaccharide (WSP) was extracted and purified from *Astragalus gombo* seeds (Fabaceae) harvested in Septentrional Sahara (Ouargla, Algeria) with a yield of 6.8% (w/w of the dry seed ground). It was characterized by gas chromatography coupled to the mass spectrometry (GC–MS), size exclusion chromatography with Multi-Angle Light Scattering analysis (SEC–MALLS), high-resolution <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and rheological measurements. The structural characterization indicated that this WSP fraction is a galactomannan with a mannose/galactose ratio of 1.7 formed by a backbone of β-(1,4)-D-mannopyranosyl residues (63%) substituted at O-6 position by a single α-galactopyranose residue (37%). SEC–MALLS analysis revealed that this galactomannan has an average molecular mass (Mw) of 1.1 × 10<sup>6</sup> g/mol, an intrinsic viscosity of 800 mL/g and, a random coil conformation structure. Rheological analysis in semi diluted regimes shown pseudo-plastic and viscoelastic behaviour.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

For decades, plant-derived polysaccharides such as mucilages or gums are considered as interesting bioactive and rheology modifying agents (Delattre et al., 2015; Jiang et al., 2010; Viebke, Assaf, & Phillips, 2014; Williams & Phillips, 2009). Galactomannans (GM), isolated from leguminous seeds, serve naturally as energy-reserve polysaccharides and have industrial interest as binding, stabilizing, gelling or thickening agents (Viebke et al., 2014; Bento et al., 2013; Srivastava & Kapoor, 2005; Daoud, 1932). Their chemical structure consists of a (1 → 4)-β-D-mannopyranosyl carbohydrate backbone randomly substituted by (1 → 4) and/or (1 → 6)-α-D-galactopyranosyl side chains (Cerqueira et al., 2011; Vendruscolo et al., 2009; Srivastava & Kapoor, 2005; Dea & Morrison, 1975). More broadly, the variation of their molecular weight and mannose/galactose molar ratio, which are closely linked to their botanic source, are the most important parameters being relevant for their biological functions and their rheological behaviour (Muschin

& Yoshida, 2012; Srivastava & Kapoor, 2005; McDougall et al., 1996). Due to this wide range of properties, Locust bean gum from seeds of carob tree (*Ceratonia siliqua*) and guar gum from seeds of *Cyamopsis tetragonolobus* are extensively used in food systems, pharmaceutical and in cosmetic industries for many applications (Dionisio & Grenha, 2012; Thombare, Jha, Mishra, & Siddiqui, 2016; Viebke et al., 2014; Williams & Phillips, 2009). However, with an increasing industrial demand it is essential to identify new sources of polysaccharides from plants growing in extreme and unfavourable climatic conditions (Peters et al., 2015; Shabani, Askari, Jahanbin, & Khodaeian, 2016; Smirnova, Mestechkina, & Sherbukhin, 2004). In this context, the screening of polysaccharides from plants of the Algerian desert characterized by very restrictive edaphic-climatic conditions (very low precipitation and high mean annual temperatures) attracts a great interest of exploration. Indeed, they accumulate polysaccharides to retain water and as energetic reserve.

Some plants, especially from Fabaceae family are described and used for traditional medicinal applications by people living in the Sahara desert and elsewhere (Davis, 1982; He et al., 2016; Hernandez et al., 2012; Rather & Shahid-Ul-Islam, 2015; Rios & Waterman, 1997). Among them, *Astragalus* is a well-known genus

\* Corresponding author.

E-mail address: [cedric.delattre@uca.fr](mailto:cedric.delattre@uca.fr) (C. Delattre).

**ANNEXE 2 : Participation à des congrès nationaux et internationaux.**

1. Delattre C., Petera B., Boual Z., Pierre G., Benaoun F., **Chouana T.**, Gardarin C., Ould El Hadj M., Fenoradosoa T., Michaud P. Ethnobotanical plants of Africa: From traditional use toward bioactive polysaccharides as drugs of tomorrow. 18 th European Carbohydrate Symposium, Moscow, Russia, 2-6 August **2015**. Communication orale.
2. Delattre C., Petera B., Boual Z., Pierre G., Benaoun F., **Chouana T.**, Gardarin C., Ould El Hadj M., Fenoradosoa T., Michaud P. Ethnobotanique et Afrique : vers la découverte des nouveaux médicaments de demain ? 9<sup>ième</sup> Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, COFrRoCA. Clermont-Ferrand, France, 29 Juin-01 Juillet **2016**. Communication orale.



## RESUME

*Astragalus gombo* Bunge (*Fabaceae*) est une plante bien représentée dans le Sahara Septentrional Est Algérien (région de Ouargla, Algérie) et couramment utilisée comme fourrage pour les animaux ou en médecine traditionnelle. Malgré de nombreuses publications sur la richesse en polysaccharides d'autres espèces appartenant au genre *Astragalus* et la description de leurs propriétés biologiques putatives ou avérées, aucune étude ne s'est intéressée à l'espèce *gombo*. L'objectif de ce travail de thèse a donc été de réaliser des investigations sur plusieurs parties de cette plante en vue d'extraire, identifier et caractériser son contenu en polysaccharides. Dans un second temps les propriétés biologiques et rhéologiques de ces polymères ont été étudiées afin d'identifier d'éventuelles voies de valorisation. Les résultats obtenus ont permis de détecter la présence de composés pectiques et hémicellulosiques dans la tige d'*Astragalus gombo* et celle d'un galactomannane dans les graines. Le galactomannane est de haute masse moléculaire ( $1,1 \times 10^6$  Da) et est constitué d'une chaîne principale de  $\beta$ -(1→4)-D-mannane ramifiée en  $\alpha$ -(1→6) par des résidus D-galactopyranoses avec un rapport M/G de 1,7. La caractérisation de ses propriétés rhéologiques a révélé un comportement typique rhéofluidifiant et des propriétés viscoélastiques. L'étude des activités biologiques associées à ce biopolymère a révélé son potentiel comme prébiotique et antioxydant.

**Mots Clefs :** *Astragalus*, polysaccharide, galactomannane, Sahara.

## ABSTRACT

*Astragalus gombo* Bunge (*Fabaceae*) is a terrestrial plant occurring in the East Septentrional Sahara (Ouargla, Algeria). It is commonly used as fodder or in traditional medicine by local populations. Despite numerous publications focusing on polysaccharidic contents of *Astragalus* species and the designation of their putative or proved biological activities, no study has examined those of *A. gombo*. The objective of this thesis was firstly to investigate several organs of this plant for their polysaccharide contents. In a second step, the biological and rheological properties of these biopolymers have been studied to identify ways of adding value. Results led to the identification of pectic compounds and hemicelluloses in the rods of *Astragalus gombo* whereas a galactomannan was detected in its seeds. This galactomannan was a high molecular weight macromolecule composed of a  $\beta$ -(1→4)-D-mannan skeleton ramified by residues of D-galactopyranoses. The M/G ratio was of 1.7. The characterization of its rheological behavior was typical of that of a rheofluidifiant fluid with viscoelastic properties. The study of its biological properties showed its potential as prebiotic and antioxidant agent.

**Keywords :** *Astragalus*, polysaccharide, galactomannan, Sahara.